



---

# **Einflüsse der Photophysik und Photochemie von Cyaninfarbstoffen auf die Lokalisationsmikroskopie**

---

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dominic Andreas Helmerich

geboren in Werneck

Würzburg, 2021



Eingereicht am:.....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Dr. Sebastian van de Linde

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile“**

Aristoteles, verkürzt aus Metaphysik VII 17, 1041b



## Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben sich hochauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethoden, basierend auf der Lokalisation einzelner Fluorophore, zu einem leistungsstarken Werkzeug etabliert, um Fluoreszenzbilder weit unterhalb der Auflösungsgrenze zu generieren. Hiermit können räumliche Auflösungen von  $\sim 20$  nm erzielt werden, was weit unterhalb der Beugungsgrenze liegt. Dabei haben zahlreiche Optimierungen und Entwicklungen neuer Methoden in der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie die Genauigkeit der Ortspezifischen Bestimmung einzelner Fluorophore auf bis zu  $\sim 1 - 3$  nm erhöht. Eine Auflösung im molekularen Bereich, weit unterhalb von  $\sim 10$  nm bleibt allerdings herausfordernd, da die Lokalisationsgenauigkeit nur ein Kriterium hierfür ist. Allerdings wurde sich in den letzten Jahren überwiegend auf die Verbesserung dieses Parameters konzentriert. Weitere Kriterien für die fluoreszenzmikroskopische Auflösung sind dabei unter anderem die Markierungsdichte und die Kopplungseffizienz der Zielstruktur, sowie der Kopplungsfehler (Abstand zur Zielstruktur nach Farbstoffkopplung), die sich herausfordernd für eine molekulare Auflösung darstellen. Auch wenn die Kopplungseffizienz und -dichte hoch und der Kopplungsfehler gering ist, steigt bei Interfluorophordistanzen  $< 5$  nm, abhängig von den Farbstoffen, die Wahrscheinlichkeit von starken und schwachen Farbstoffwechselwirkungen und damit von Energieübertragungsprozessen zwischen den Farbstoffen, stark an. Daneben sollten Farbstoffe, abhängig von der Lokalisationsmikroskopiemethode, spezifische Kriterien, wie beispielsweise die Photoschaltbarkeit bei *d*STORM, erfüllen, was dazu führt, dass diese Methoden häufig nur auf einzelne Farbstoffe beschränkt sind. In dieser Arbeit konnte mithilfe von definierten DNA-Origami Konstrukten gezeigt werden, dass das Blinkverhalten von Cyaninfarbstoffen unter *d*STORM-Bedingungen einer Abstandsabhängigkeit aufgrund von spezifischen Energieübertragungsprozessen folgt, womit Farbstoffabstände im sub-10 nm Bereich charakterisiert werden konnten. Darüber hinaus konnte diese Abstandsabhängigkeit an biologischen Proben gezeigt werden. Hierbei konnten verschiedene zelluläre Rezeptoren effizient und mit geringem Abstandsfehler zur Zielstruktur mit Cyaninfarbstoffen gekoppelt werden. Diese abstandsabhängigen Prozesse und damit Charakterisierungen könnten dabei nicht nur spezifisch für die häufig unter *d*STORM-Bedingungen verwendeten Cyaninfarbstoffe gültig sein, sondern auch auf andere Farbstoffklassen, die einen Auszustand zeigen, übertragbar sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hochauflösende

*d*STORM Aufnahmen unabhängig vom Farbstoffkopplungsgrad der Antikörpern sind, welche häufig für Standardfärbungen von zellulären Strukturen verwendet werden. Dabei konnte durch Photonenkoinzidenzmessungen dargelegt werden, dass aufgrund komplexer Farbstoffwechselwirkungen im Mittel nur ein Farbstoff aktiv ist, wobei höhere Kopplungsgrade ein komplexes Blinkverhalten zu Beginn der Messung zeigen. Durch die undefinierten Farbstoffabstände an Antikörpern konnte hier kein eindeutiger Energieübertragungsmechanismus entschlüsselt werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Farbstoffaggregate bzw. H-Dimere unter *d*STORM-Bedingungen destabilisiert werden. Durch die zuvor erwähnten DNA-Origami Konstrukte definierter Interfluorophordistanzen konnten Energieübertragungsmechanismen entschlüsselt werden, die auch für die Antikörper diverser Kopplungsgrade gültig sind. Des Weiteren konnten, ausgelöst durch komplexe Energieübertragungsprozesse höherer Kopplungsgrade am Antikörper, Mehrfarbenaufnahmen zellulärer Strukturen generiert werden, die über die spezifische Fluoreszenzlebenszeit separiert werden konnten. Dies stellt hier eine weitere Möglichkeit dar, unter einfachen Bedingungen, schnelle Mehrfarbenaufnahmen zellulärer Strukturen zu generieren. Durch die Verwendung des selben Farbstoffes unterschiedlicher Kopplungsgrade kann hier nur mit einer Anregungswellenlänge und frei von chromatischer Aberration gearbeitet werden. Neben den photophysikalischen Untersuchungen der Cyaninfarbstoffe Cy5 und Alexa Fluor 647 wurden diese ebenso photochemisch näher betrachtet. Dabei konnte ein neuartiger chemischer Mechanismus entschlüsselt werden. Dieser Mechanismus führt, ausgelöst durch Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), zu einer Photozerschneidung des konjugierten Doppelbindungssystems um zwei Kohlenstoffatome, was zu strukturellen und spektroskopischen Veränderungen dieser Farbstoffe führt. Auf Grundlage dieses Mechanismus konnte eine neue DNA-PAINT Methode entwickelt werden, die zu einer Beschleunigung der Aufnahmezeit führt.

---

## Summary

In recent years, high-resolution fluorescence microscopy methods based on the localization of individual fluorophores have become a powerful tool for generating fluorescence images below the diffraction limit. This means that spatial resolutions of  $\sim 20$  nm can now be achieved, which are far below the diffraction limit. Numerous optimizations and developments of new methods in single molecule localization microscopy have increased the localization precision up to  $\sim 1 - 3$  nm. However, a spatial resolution in the molecular range, far below  $\sim 10$  nm, remains challenging, because the localization precision is only one criterion for achieving molecular resolution. However, in recent years the main focus has been on improving this parameter. Additional challenging criteria for achieving molecular resolution include the coupling density and the coupling efficiency of the target structure, as well as the linkage error (distance to the target structure after dye coupling). Even if a high coupling density and coupling efficiency, as well as a low linkage error can be achieved, interfluorophore distances  $< 5$  nm increase the probability of strong and weak dye interactions and thus energy transfer processes between the dyes strongly increase. In addition, depending on the localization microscopy method, dyes should fulfill specific criteria, such as photoswitchability for *d*STORM, which means that these methods are often limited to a few dyes. In this work it could be shown with the help of defined DNA origami constructs that the blinking behavior of cyanine dyes follows a distance dependence under *d*STORM conditions due to specific energy transfer processes. With this, dye distances in the sub-10 nm range could be characterized. In addition, this distance dependency could be shown on biological samples. Here, different cellular receptors could be efficiently labeled with Cy5 dyes at a low linkage error. These distance dependent processes and thus characterizations could not only be specifically valid for cyanine dyes that are frequently used under *d*STORM conditions, but also be transferable to other classes of dyes that show a fluorescence off states. In addition, it could be shown that high resolution *d*STORM images are independent of the degree of labeling of antibodies, which are often used for standard staining of cellular structures. It could be shown by photon antibunching measurements that, due to complex strong and weak dye interactions, only one dye is emitting on average, showing a complex blinking behavior at the beginning of the measurement with higher degrees of labeling. Due to the undefined distance between the dyes on antibodies, no clear energy transfer mechanism could be deciphered.

---

Nevertheless, it could be shown that dye aggregates or H-dimers are destabilized under *d*STORM conditions. The mentioned DNA origami constructs of defined interfluorophore distances made it possible to decipher energy transfer mechanisms that are also valid for antibodies of various degrees of labeling. Furthermore, triggered by complex energy transfer processes at higher degree of labeling on the antibody, multicolor images of cellular structures could be generated, which could be separated over the specific fluorescence lifetime. This represents a further possibility to generate fast multicolor images of cellular structures at simple buffer conditions. Here, by using the same dyes at different degrees of labeling, it is possible to work with only one excitation wavelength and free of chromatic aberration. In addition to the photophysical investigations of the cyanine dyes Cy5 and Alexa Fluor 647, the photochemical behaviour of these dyes was also examined more closely. Here, a novel chemical mechanism could be deciphered. This mechanism, triggered by singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), leads to a phototruncation of the conjugated double bond system by two carbon atoms resulting in structural and spectroscopic changes of this dye. On the basis of this mechanism, a new DNA-PAINT method could be developed, leading to faster recording times.





|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | Computerbasierte Gestaltung des DNA-Origami .....   | 35 |
| 3.3.2 | Stabilitätssimulation des DNA-Origami .....   | 35 |
| 3.3.3 | Hybridisierung des DNA-Origami .....  | 36 |
| 3.3.4 | Aufreinigung und Qualitätskontrolle.....  | 37 |
| 3.4   | Dendronsyste und -strukturen.....   | 38 |
| 3.5   | Probenpräparationen.....  | 39 |
| 3.5.1 | Fluorophore .....   | 39 |
| 3.5.2 | Oligonukleotidmodifizierung .....   | 39 |
| 3.5.3 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....  | 40 |
| 3.5.4 | Proteinmarkierung .....   | 40 |
| 3.5.5 | Zellpräparation und Zellfärbung .....   | 41 |
| 3.5.6 | Einzelmoleküloberflächenpräparation .....   | 43 |
| 4     | Ergebnisse.....   | 46 |
| 4.1   | Photokonversion von Cyaninfarbstoffen.....  | 46 |
| 4.1.1 | Ensemble- und bildgebende Spektroskopie.....  | 46 |
| 4.1.2 | Photokonvertierung ermöglicht Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie .....   | 53 |
| 4.2   | Einfluss des Farbstoffkopplungsgrades auf die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopiemethode <i>d</i> STORM .....   | 58 |
| 4.2.1 | Ensemble- und bildgebende spektroskopische Analysen .....   | 59 |
| 4.2.2 | Einzelmoleküllokalisations- und einzelmolekülspektroskopische Analysen..  | 65 |
| 4.3   | Analyse und biologische Anwendung abstandsabhängiger photophysikalischer Phänomene von Cyaninfarbstoffen unter <i>d</i> STORM-Bedingungen mittels DNA-Origami und Rezeptoren..... | 76 |
| 4.3.1 | Herstellung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte .....   | 77 |
| 4.3.2 | Einzelmolekülanalysen der DNA-Origami Konstrukte .....  | 80 |
| 4.3.3 | Photophysikalische Rezeptoranalysen .....   | 97 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4.4 | Spektroskopische Analysen von Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen .....   | 99  |
| 5   | Diskussion.....  | 104 |
| 5.1 | Photozerschneidung von Cyaninfarbstoffen.....  | 104 |
| 5.2 | Photophysikalisches Verhalten mehrfach markierter Antikörper unter <i>d</i> STORM-Bedingungen .....                                      | 111 |
| 5.3 | Analyse abstandsabhängiger photophysikalischer Effekte von Cyaninfarbstoffen unter <i>d</i> STORM-Bedingungen im sub-10 nm Bereich ..... | 118 |
| 5.4 | Fluoreszenzlöschung von Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen.....  | 133 |
| 6   | Fazit .....  | 136 |
| 7   | Ausblick .....   | 140 |
| 8   | Literaturverzeichnis.....  | 146 |
| 9   | Anhang .....   | 156 |
|     | Abkürzungsverzeichnis.....   | 159 |
|     | Danksagung .....   | 161 |
|     | Publikationsliste .....  | 163 |
|     | Lebenslauf .....   | 164 |
|     | Eidesstattliche Erklärung.....   | 165 |

## 1 Einleitung

Die Entwicklung optischer Geräte und Techniken, die es ermöglichen sehr kleine Komponenten und Objekte, wie beispielsweise Bakterien oder andere Einzeller, vergrößert zu beobachten und zu analysieren, eröffnete neue Möglichkeiten und Potenziale hin zu modernen wissenschaftlichen Methoden, Fragestellungen und Untersuchungen. Gemäß ihrer Verwendung, sehr kleine Partikel und Strukturen vergrößert zu visualisieren, wurden diese optischen Geräte Mikroskope (griechisch: *mikrós* „klein“; *skopeín*: „betrachten“) genannt [1]. Heutzutage sind diese optischen Hilfsmittel ein fester Bestandteil der modernen Wissenschaft und trugen einen fundamentalen Beitrag zu biologischen und medizinischen Entdeckungen bei [1].

Die Geschichte des Mikroskops reicht dabei mehrere Jahrhunderte zurück, wobei die ersten ihrer Art, im Vergleich zu heutigen Mikroskopen, einen sehr simplen Aufbau verfolgten und nur aus einem System von wenigen Linsen bestanden [1]. Dieser einfache Aufbau reichte aus, um erste Entdeckungen und Beobachtungen zu machen und führte zu dem Bestreben diese optischen Aufbauten weiter zu verbessern. Eine der ersten Pioniere auf diesem Feld der Mikroskopie, die davon inspiriert waren diese Technik weiter zu verbessern, waren unter anderem CHRISTIAAN HUYGENS oder EUSTACHIO DIVINI, was zu weiteren fundamentalen Entdeckungen, wie beispielsweise durch ANTONI VAN LEEUWENHOEK oder ROBERT HOOKE, führte [1]. Die beiden letzteren prägten durch ihre Entdeckungen und Beobachtungen mit diesen optischen Aufbauten das Feld der klassischen Biologie, schafften bis heute gültige und fundamentale Standards und legten den Grundstein der modernen biologischen Wissenschaft. In den folgenden Jahrhunderten wurde durch intensive Forschungen an diesen optischen Aufbauten das physikalische Verständnis stetig vorangetrieben, was letztendlich zu einer erhöhten Leistungsfähigkeit dieser optischen Aufbauten, u. a. mithilfe von verbesserten Linsen oder der Einführung von Immersionsobjektiven, führte [1, 2]. Doch auch durch Verbesserungen der optischen Komponenten der Mikroskope stieß die Leistungsfähigkeit in Bezug auf die Auflösung sukzessiv an ihre Grenze. Als einer der ersten Pioniere auf diesem Feld erkannte ERNST ABBE, dass die Auflösung des Mikroskops nicht durch die Qualität ihrer optischen Komponenten beschränkt ist, sondern hauptsächlich durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts, sowie der numerischen Apertur (dem Öffnungswinkel, in dem das einfallende Licht eingefangen wird) des Objektivs limitiert ist und belegte mathematisch, dass

---

die theoretische maximale laterale Auflösung eines Lichtmikroskops für sichtbares Licht aufgrund von Beugungseffekten auf  $\sim 200$  Nanometer (nm) begrenzt ist [3, 4].

Parallel dazu setzte GEORGE GABRIEL STOKES im 19. Jahrhundert mit der Beobachtung und Entdeckung eines photophysikalischen Phänomens, dass er selbst „Fluoreszenz“ nannte, einen neuen Meilenstein in den modernen Lebenswissenschaften [5]. Anfang des 20. Jahrhunderts nutzte AUGUSTUS KÖHLER zufällig die Fluoreszenz bei seinen Mikroskopiearbeiten, als er, gemäß den mathematischen Begründungen von ERNST ABBE, das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops ausreizen und verbessern wollte, indem er seine Präparate mit UV-Licht anregte um sie dann fotografisch zu dokumentieren und festzuhalten [1]. Wenig später wurde eines der ersten Fluoreszenzmikroskope u.a. von OSKAR HEIMSTÄDT wissenschaftlich vorgestellt, das, ebenso wie bei der Arbeit von AUGUSTUS KÖHLER, mit UV-Licht arbeitete [6]. In den darauffolgenden Jahren wurden erstmals, u. a. von STANISLAUS VAN PROWAZEK, Fluoreszenzfarbstoffe für mikroskopische Arbeiten benutzt [1, 7]. Die Kombination aus fluoreszenzfähigen Molekülen und Lichtmikroskopen läutete die Zeit neuer moderner Techniken der Mikroskopie ein und führte zu komplexen Aufbauten der optischen Komponenten der Mikroskope. Das Auflösungsvermögen dieser Fluoreszenzmikroskope bleibt jedoch weiterhin limitiert. Durch die Arbeiten von JOHN WILLIAM STRUTT, 3. BARON RAYLEIGH und von HERMANN VON HELMHOLTZ wurde mathematisch beschrieben, dass die laterale Auflösung, ähnlich wie bei den Erkenntnissen von ERNST ABBE, physikalisch auf wenige hunderte Nanometer begrenzt ist [8, 9]. Diese physikalische Begrenzung der Auflösung in der Fluoreszenzmikroskopie wurde, gemäß seinen Arbeiten und Erkenntnisse, als Rayleigh-Kriterium festgehalten [1, 8, 9]. Dieses Kriterium beschreibt, dass zwei selbstleuchtende punktförmige Lichtquellen, wie Fluoreszenzfarbstoffe, ein spezifischen Beugungsmuster aufgrund der wellenlängenabhängigen Lichtbrechung an den optischen Komponenten aufweisen, und einen gewissen Mindestabstand zueinander aufweisen müssen, damit diese Punktlichtquellen getrennt wahrgenommen werden können [8, 9]. Diese wellenlängenspezifischen Beugungsmuster werden allgemein als Beugungsscheibchen oder Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet [9]. Nach diesem Kriterium ist es vereinfacht gesagt in der Fluoreszenzmikroskopie physikalisch nicht möglich zwei Lichtpunkte getrennt aufzulösen, die näher als die halbe Wellenlänge ihres ausgesendeten Lichtes entfernt sind, was demzufolge eine maximale laterale Auflösung von  $\sim 200$  nm entspricht [9, 10].

In den letzten Jahrzehnten wurde durch intensive Forschungen, sowohl im Bereich der Fluoreszenzfarbstoffe, als auch im Bereich der Mikroskopie, zahlreiche mikroskopische Techniken etabliert, die es ermöglichen, dass physikalisch limitierte Auflösungsvermögen der Mikroskope zu umgehen. Hierdurch wurde erneut ein weiterer Meilenstein für die Lebenswissenschaften erreicht, der es u. a. ermöglicht einen detaillierten Einblick in den zellulären Aufbau zu geben und darüber hinaus zelluläre Abläufe optisch sichtbar zu machen. Dies läutete eine neue Ära der Mikroskopie ein und brachte das Feld der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie hervor, das für biologische und medizinische Forschungen von großer Bedeutung und großem Nutzen ist. Diese mikroskopischen Techniken setzen das Rayleigh-Kriterium nicht außer Kraft, sondern umgehen dieses, indem sie die Zustände der Fluoreszenzfarbstoffe räumlich und/oder zeitlich aktiv ändern und überführen [10]. Eine dieser Techniken, die den Zustand der Fluorophore räumlich aktiv ändert, ist beispielsweise die „stimulierte Emissionsverarmung“ (engl.: „stimulated emission depletion“, kurz STED), die es durch technische Vorgehensweisen und dem Aufbau des Mikroskops ermöglicht, Punktlichtquellen, die unterhalb des Rayleigh-Kriteriums liegen, räumlich aufzulösen [11, 12]. Dabei wird die Emission eines aktiv angeregten Fluorophors durch intensives Einstrahlen energieärmerer Wellenlänge künstlich provoziert und abgeregt, wobei die Punktlichtquelle bzw. die Punktspreizfunktion damit drastisch verkleinert wird und dadurch die räumliche Auflösung verbessert wird [10, 11, 12]. Diese Methode wird aufgrund ihres Funktionsprinzips zu den sogenannten „reversibel sättigbaren optischen Fluoreszenzübergängen“ (engl.: „reversible saturable optical linear fluorescence transitions“, kurz RESOLFT) gezählt [10]. Eine weitere Methode zur Umgehung der Auflösungsgrenze ist das zeitliche separieren der Emission der Fluorophore [10, 13]. Dabei kann u. a. wie bei der „photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie“ (engl.: „photoactivated localization microscopy“, kurz PALM) durch zusätzliches Einstrahlen einer Wellenlänge die Fluoreszenz eines Farbstoffes aktiviert (Photoaktivierung) oder in eine andere Wellenlänge umgewandelt (Photokonvertierung) werden, oder wie bei der Methode „direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie“ (engl.: „direct stochastic optical reconstruction microscopy“, kurz dSTORM) die Übergänge der Farbstoffe zwischen einem stabilen nicht fluoreszierenden Zustand und einen fluoreszierenden Zustand photochemisch reversibel provoziert werden und somit die Anzahl der fluoreszenzfähigen Farbstoffe stochastisch kontrolliert werden [10, 14, 15, 16]. Diese Methoden werden zu der stochastischen Lokalisationsmikroskopie gezählt. Durch geeignete Algorithmen kann der Massenschwerpunkt und damit das Zentrum der PSF der aufgenommenen Punktemitter

bestimmt und lokalisiert werden [13, 14, 15, 16]. Somit wurde es u. a. mit diesen Methoden ermöglicht, die Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie zu umgehen und eine laterale Auflösung von  $\sim 10 - 20$  nm zu realisieren, die aber mit diesen erwähnten Methoden mathematisch unbegrenzt ist [10, 11, 12, 13, 14, 15]. Durch weitere technische Innovationen und Verbesserungen wurde es auch ermöglicht nicht nur lateral, sondern auch axial die Auflösung drastisch zu verbessern und somit auch hochaufgelöste dreidimensionale Bilder und Aufnahmen von biologischen Proben zu erzeugen, wobei die axiale Reichweite durchaus begrenzt ist [17, 18, 19]. Darüber hinaus ist es nicht nur möglich sich auf einen Farbstoff und dessen Emissionwellenlänge zu beschränken, sondern die heutigen Methoden sind durchaus darauf ausgelegt auch hochaufgelöste Aufnahmen mit mehrere Farbstoffe verschiedener Wellenlängen oder auch der selben Wellenlänge sowohl lateral, als auch axial simultan zu erzeugen, um beispielsweise Proteininteraktionen zu analysieren [19, 20, 21, 22, 23]. Die Anzahl der möglichen Farbstoffe ist allerdings begrenzt, da sich nicht jeder Farbstoff, aufgrund seiner photophysikalischen Eigenschaften, gleich gut für eine Methode eignet und meistens, wie bei Mehrfarben-*d*STORM, ein Kompromiss der photochemischen Bedingungen gefunden werden muss [21]. Dabei ist man nicht mehr nur auf die Emissionsintensität beschränkt, sondern kann sich weitere photophysikalische Eigenschaften der Farbstoffe, wie beispielsweise die Fluoreszenzlebenszeit, zu Nutze machen [24, 25].

Die beschriebenen Methoden gehen bei der Markierung der zu analysierenden Zielstrukturen meistens nach einem gängigen gut etablierten Standardverfahren vor. So wird die gewünschte Interessenstruktur mittels Immunofluoreszenzfärbung, bestehend aus einem primären Antikörper, der die Zielstruktur bindet, und einem sekundären Antikörper, der den primären Antikörper bindet, markiert. Dabei ist der sekundäre Antikörper meistens über eine N-Hydroxysuccinimid Ester (NHS-Ester), der mit den primären Aminen des Antikörpers reagiert, mit einer Vielzahl von fluoreszierenden Farbstoffen kovalent modifiziert [26]. Über eine solche NHS-Reaktion können relativ simpel alle gewünschten Zielstrukturen, die eine Aminfunktion tragen, wie beispielsweise Proteine, mit Farbstoffen gekoppelt werden und somit für die gewünschte hochauflösende Fluoreszenzmethode präpariert werden [26]. Dabei ist allerdings nicht kontrollierbar, wo die Farbstoffe und wie viele Farbstoffe an das gewünschte Zielprotein binden, da die NHS-Ester mit allen frei zugänglichen Lysinen und deren primären Aminen reagieren können [26, 27]. Da die Größe eines hierbei üblich genutzten Immunglobulin G Antikörpers (IgG) im unteren zweistelligen Nanometerbereich liegt ( $\sim 10$  nm), ist die Wahrscheinlichkeit gegeben,

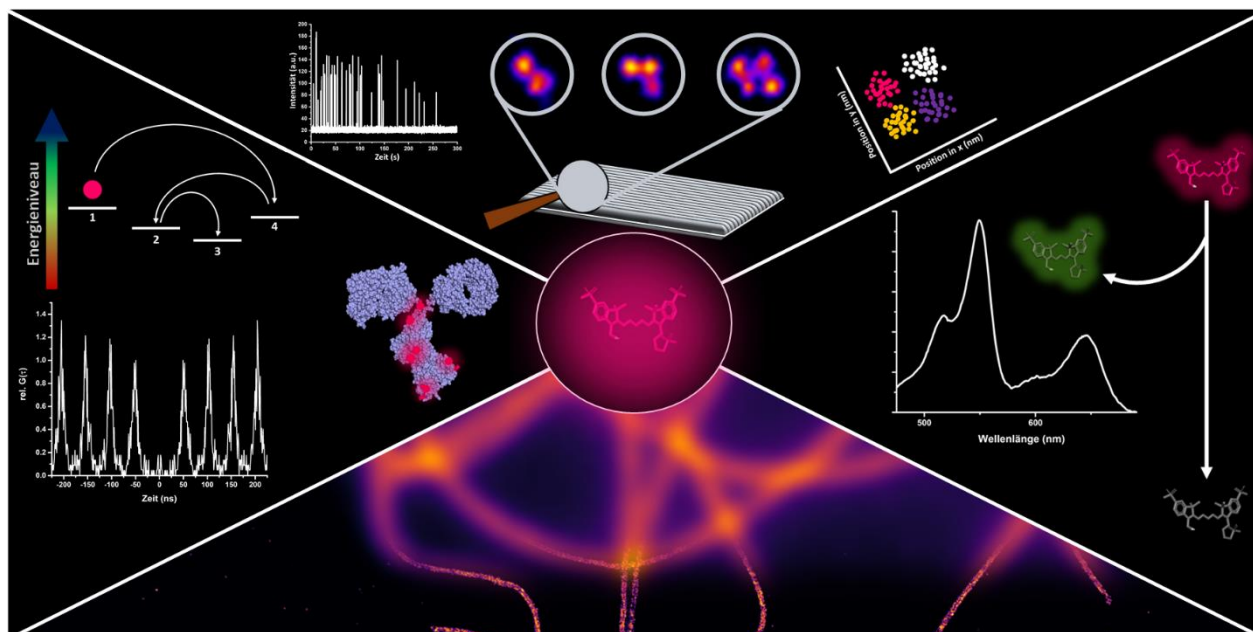
dass Farbstoffe in unmittelbarer räumlicher Nähe binden und miteinander interagieren können, was zur Bildung von Farbstoffaggregaten und damit auch zu zahlreichen Energieannihilationsprozessen führen kann [28, 29, 30]. Des Weiteren ist es auch möglich, dass das Epitop der Antikörper, das für die Bindung an die Zielstruktur verantwortlich ist, durch Farbstoffkopplungen blockiert wird und damit die Bindungsaffinität des Antikörpers negativ beeinflusst wird [31]. Daher ist man darauf bestrebt, den Farbstoffkopplungsgrad (engl.: „Degree Of Labeling“, kurz DOL) möglichst im mittleren einstelligen Bereich zu halten, um einerseits die negativen Effekte wie Energieannihilationsprozesse oder niedrigere Bindungsaffinitäten des Antikörpers zu vermeiden und andererseits dennoch eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung zu haben, die für ausreichend hohe Emissionsintensitäten sorgen [31]. Da die laterale Auflösung der bereits beschriebenen Mikroskopiemethoden im unteren zweistelligen Nanometerbereich liegt, fließen hier auch u. a. Fehler bzw. Ungenauigkeiten aufgrund der Größe der Markierungsmethoden mit ein [32, 33]. So ist es einerseits beispielsweise möglich, dass Proteine, die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, aufgrund der Größe eines Antikörpers, sterisch nicht von diesen gebunden werden können. Andererseits muss der Fehler der Größe der Markierungsmethode, beispielsweise die Größe eines Antikörpers, und damit die Distanz zur analysierenden Zielstruktur berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollte die Zielstruktur auch für die Markierungsmethode zugänglich sein, was bei Proteinanalysen in Membranstrukturen mittels Immunofluoreszenzfärbung durchaus hinderlich sein kann. Daher haben sich andere Markierungsmethoden, wie beispielsweise die sog. „Klick-Chemie“ etabliert, die es u. a. ermöglicht gewünschte Zielstrukturen direkt spezifisch mit Farbstoffen zu markieren und dabei die Distanz der Markierung zur Interessensstruktur auf ein Minimum zu reduzieren [34]. Dabei kann die Zielstruktur direkt bei der Proteinbiosynthese der Zelle mit einem Trans-Cycloocten (TCO) modifiziert werden [34, 35]. Dieses kann anschließend mit einem Tetrazin modifizierten Farbstoff über eine inverse Elektronenbedarfs-Diels-Alder-Reaktion (engl.: „inverse electron demand diels alder“, kurz IEDDA) gekoppelt und somit die Zielstruktur mit einem Fluorophor markiert und für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie präpariert werden [36, 37, 38]. Bei dieser Methode ist spezifisch kontrollierbar wo die Farbstoffe binden und wie viele Farbstoffe binden können [34, 35, 36, 37, 38].

Für viele wissenschaftliche Analysen in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie ist die Immunofluoreszenzfärbung, auch trotz des relativ hohen Fehlers der Distanz zur Zielstruktur, ausreichend und findet dort u. a. auch wegen der relativ einfachen Handhabung dieser



---

Markierungsmethode breite Anwendung. Dabei sollte, beispielsweise für die Mikroskopiemethode *d*STORM, eine ideale Probe sowohl eine hohe Markierungsspezifität zur Zielstruktur, einen geringen Grad unspezifischer Markierungen, als auch eine hohe Fluoreszenzintensität und ein gutes Blinkverhalten der Farbstoffe, bestehend aus einem langlebigen nicht fluoreszierenden Zustand (Zeitskala: Sekunden [s]) und einen kurzlebigen fluoreszierenden Zustand (Zeitskala: Millisekunden [ms]), für eine präzise Lokalisierung aufweisen. In realen Proben ist dies häufig gegeben, dennoch können starke Abweichungen in der Fluoreszenzintensität, Markierungsspezifität und dem Blinkverhalten der Farbstoffe beobachtet werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe können durch photophysikalische Effekte u. a. durch die zu markierende Zielstruktur selbst und deren Mikroumgebung oder durch Farbstoffinteraktionen, negativ oder positiv beeinflusst werden. Der Einfluss des Labelgrades der Antikörper auf das photochemische Blinkverhalten der Farbstoffe oder auf die laterale Auflösung der hochauflösenden Rekonstruktionsmikroskopiemethode *d*STORM wurde dabei weitestgehend nicht betrachtet. Dieser Effekt auf die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethode *d*STORM soll als Teil dieser Dissertation näher beleuchtet und analysiert werden. Darüber hinaus soll hier das photophysikalische und photochemische Verhalten von Cyaninfarbstoffen näher beleuchtet und verstanden werden. Dabei gilt ein besonderes Augenmerk dem photophysikalische Blinkverhalten der Cyaninfarbstoffe zu verschiedenen Distanzen, was über definierte DNA-Origami Konstrukte näher analysiert wird. Darüber hinaus ist literaturbekannt, dass es, abhängig von der Farbstoffklasse, bei Anregung dieser zu photochemischen Effekten der Farbstoffe kommen kann, die die photophysikalische Eigenschaften beeinflussen und damit unter anderem Mehrfarbenexperimente negativ beeinträchtigen können [39]. Dieses Phänomen soll als weiterer Teil dieser Arbeit auch für die in der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie *d*STORM häufig verwendeten Cyaninfarbstoffe näher betrachtet werden. In Abbildung 1 ist eine schematische Übersicht aller Kernaspekte dieser Arbeit aufgeführt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kernelemente und Teilaspekte dieser Arbeit.** Der für diese Arbeit hauptsächlich verwendete Fluoreszenzfarbstoff „Cyanine 5“ ist im Zentrum angefärbt dargestellt. Untersuchung des Einflusses des Farbstoffkopplungsgrades von sekundären Antikörpern für die hochauflösende Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie (links). Zu sehen ist ein mehrfach markierter Antikörper, der über Energieübertragung angeregter Farbstoffe benachbarte Farbstoffe beeinflusst, was durch Photonenkoinzidenzanalysen unter *d*STORM üblichen Photoschaltpuffern ersichtlich ist. Mittels DNA-Origami Technologie hergestellte 4fach markierte DNA Hilfsstrukturen zur Analyse der photophysikalischen Eigenschaften sich annähernden Farbstoffen unter *d*STORM-Bedingungen (oben). Molekulare Entschlüsselung eines neuartigen chemischen Mechanismus, der dazu führt, dass der verwendete Cyaninfarbstoff, unter gewissen Bedingungen, eine Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften zeigt (rechts), was zu Fehlinterpretationen in Förster-Resonanz-Energieübertragungs- oder Mehrfarbenexperimenten führen könnte. Diese Phänomene und Analysen sind wichtige Bausteine beim Verständnis und der Verbesserung des Auflösungsvermögens von Lokalisationsmikroskopiemethoden, wie beispielsweise die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopiemethode *d*STORM, deren Potential im unteren Abschnitt der Abbildung zu sehen ist, wobei hier ein konventionelles Fluoreszenzbildes, von immunomarkierten Mikrotubuliestrukturen, mit dem hochaufgelösten rekonstruierten *d*STORM-Bild, des selben Ausschnittes, überlagert wurde.

In diesem Zusammenhang soll abschließend auch die Idee eines sog. „Superemitter“, bestehend aus diversen chemisch synthetisierten und mit Farbstoff gekoppelter Dendronsyste (altgriechisch: thenthron „Baum“), die die absorbierte Energie in Form von Emission gebündelt abgeben könnten, diskutiert werden.

## 2 Theorie

Im folgenden wird der für diese Arbeit wichtige theoretische Hintergrund näher vorgestellt. Dabei sollen vor allem photophysikalische Effekte und Grundlagen, wie Absorption, Emission und Fluoreszenzlebensdauer, sowie die Methoden *d*STORM und Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie genauer betrachtet werden. Des Weiteren werden die in dieser Arbeit verwendete molekulare Hilfsstrukturen wie DNA-Origami und Dendrons näher erläutert und beschrieben.

### 2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die in diesem Kapitel beschriebenen photophysikalischen Phänomene und Effekte wurden der Lehrliteratur entnommen und können im Detail, für das weitere physikalische Verständnis, dort nachgelesen und vertieft werden [40, 41, 42, 43, 44].

#### 2.1.1 Absorption und Emission

In der Physik wird Licht als elektromagnetische Strahlung beschrieben, die sowohl Wellen, als auch Teilchencharakter besitzt, was allgemein als Wellen- und Teilchendualismus bekannt ist. Die elektromagnetische Strahlung besitzt dabei, abhängig von ihrer Wellenlänge (Skala: nm), verschiedene Energieniveaus. Je kürzer die Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung, desto höher ihr Energiegehalt. Die elektromagnetische Strahlung bzw. Teilchen (Photonen) kann/können dabei mit Materie interagieren und ihre Energie an diese übertragen. Dieses photophysikalische Phänomen wird als Absorption bezeichnet. Die Strahlung, die absorbiert werden kann, ist dabei von der atomaren Zusammensetzung der Materie abhängig. Die Atome besitzen, je nach Art des Atoms, unterschiedliche Orbitale und Anzahlen von Elektronen. Jedes Elektron eines Atoms besitzt dabei, u. a. abhängig von der Distanz zum Atomkern, diverse Energieniveaus und kann mithilfe von Energiezufuhr in ein höheres Energieniveau angehoben werden. Ein Elektron besitzt dabei einen Zustand niedrigster Energie, den es bevorzugt einnimmt. Dieses Energieniveau wird dabei als Grundzustand ( $S_0$ ) bezeichnet. Dieses Elektron kann in ein höheres Energieniveau ( $S_n$ ) versetzt werden, wenn die Energie der aufzunehmenden elektromagnetischen Strahlung den Unterschied zwischen diesen Zuständen entspricht. Diese Energie kann mithilfe der Planckschen Gleichung berechnet werden (Formel 1), wobei  $\Delta E$  die Differenz der Energieniveaus,  $h$  das plancksche Wirkungsquantum,  $\nu$  die Frequenz der

elektromagnetischen Strahlung,  $\lambda$  die Wellenlänge der Strahlung und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ist.

$$\Delta E = E_{S_n} - E_{S_0} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

In der Mikroskopie werden häufig Farbstoffe eingesetzt, die aus einem delokalisierten Elektronensystem ( $\pi$ -Elektronensystem) bestehen. Dabei ist ein Elektron nicht an einem genauen Ort lokalisiert, sondern die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Elektrons erstreckt sich über mehrere Atome, was auch als Elektronenwolke bezeichnet wird. Moleküle mit diesen Eigenschaften lassen sich besonders leicht mit Photonen des sichtbaren Spektrums ( $\sim 350 - \sim 800$  nm) anregen und damit Elektronen in ein höheres Energieniveau überführt werden. Die Absorptionsbanden dieser Moleküle zeigen dabei keine scharfe Linien, sondern ein breiteres Spektrum über mehrere 10 - 100 nm, ausgelöst durch zahlreiche verschiedene Schwingungsniveaus der Elektronen innerhalb des Grund- und angeregten Zustandes. Die Anregung eines Elektrons in ein höheres Energieniveau erfolgt dabei im Femtosekundenbereich ( $10^{-15}$ s) und ist damit schneller, als das sie vom Atomkern realisiert werden kann, was durch die BORN-OPPENHEIMER Näherung beschrieben ist. Neben der nötigen Energie zum Anregen eines Elektrons, ist auch die Übereinstimmung bzw. Kompatibilität der Schwingungsfunktionen der Energien des Elektrons im Grund- und angeregtem Zustand Voraussetzung. Demzufolge ist nach dem Frank-Condon Prinzip die Wahrscheinlichkeit bestimmter Elektronenübergänge höher und finden daher bevorzugt statt. Dies trifft auch für die Relaxation des angeregten Elektrons in den Grundzustand zu. Neben zahlreichen strahlungslosen Übergängen in den Grundzustand, ist es auch wahrscheinlich, dass die absorbierte Energie in Form der Emission eines Photons abgegeben wird. Diese Emission eines Photons wird dabei als Lumineszenz bezeichnet und kann, je nach Art des angeregten Zustandes, in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterteilt werden. Dabei spielt die Rotationsrichtung der angeregten Elektronen eine wichtige Rolle. So erfolgt die Phosphoreszenz aus dem Übergang, eines sich im Triplettzustand (T) befindlichen Elektrons, in den Grundzustand ( $S_0$ ), was Änderungen der Rotationsrichtungen des Elektrons voraussetzt. Der Übergang eines Elektrons in einen Triplettzustand ( $T_n$ ) und zurück in einen Singulattzustand ist Quantenmechanisch verboten, was bedeutet, dass dieser Übergang bzw. Interkombination (engl.: intersystem crossing , kurz ISC) mittels Rotationsrichtungsänderung mit einer geringen Wahrscheinlichkeit stattfindet und darüber hinaus ein relativ langlebiger Prozess, der im Bereich von Millisekunden (ms) bis Stunden (h) liegt. Die Fluoreszenz erfolgt ohne Änderung der



### 2.1.2 Extinktionskoeffizient, Fluoreszenzquantenausbeute und -lebenszeit

Zu den bedeutendsten Parametern eines Fluorophores zählt die Fluoreszenzquantenausbeute (engl.: quantum yield, QY), die Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ) und der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ). Dies sind spezifische Parameter eines fluoreszenzfähigen Moleküls, die u.a. dazu dienen, diese Moleküle aussagekräftig zu vergleichen. Als molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wird die Effizienz eines Moleküls bezeichnet, mit entsprechender elektromagnetischer Strahlung zu interagieren und diese zu absorbieren. Dieser Parameter ist charakteristisch für das entsprechende Molekül und ist dabei abhängig von der jeweiligen atomaren Zusammensetzung des Moleküls. Kleine chemische Veränderungen, beispielsweise durch geladene Seitenreste, können einen großen Einfluss auf die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen des absorptionsfähigen Bereichs eines Moleküls haben und damit die Absorptionsfähigkeit dieses Moleküls, sowie die photophysikalischen Eigenschaften, maßgeblich beeinflussen. Ein weiterer spezifischer Parameter eines Fluorophores ist die Fluoreszenzquantenausbeute (QY). Dieser Parameter gibt das Verhältnis der emittierten Photonen zu den absorbierten Photonen an und damit die Wahrscheinlichkeit des Fluorophores, nach Anregung, die Energie in Form der Aussendung eines Lichtteils abzugeben. Dabei werden sämtliche Relaxationswege des Fluorophores berücksichtigt (siehe Abb. 2A). Dies kann vereinfacht nach Gleichung 2 berechnet werden.

$$QY = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

Wobei  $k_r$  die Zeitkonstante der radiativen Relaxation und  $k_{nr}$  die Zeitkonstante strahlungsloser Übergangsprozesse ist. Zu diesen nicht radiativen Relaxationen zählen allgemein sämtliche Übergangspfade in den Grundzustand, die es ermöglichen, dass das angeregte Elektron seine Energie ohne Aussendung eines Photons, beispielsweise durch Schwingungs- und/oder Rotationsenergie, an die Umgebung abgibt. Dabei kann  $k_{nr}$  noch weiter unterteilt werden und Gleichung 2 um ein weiteres wichtiges photophysikalisches Phänomen, die Fluoreszenzlöschung (siehe Abschnitt 2.1.3.) erweitert werden.

Ein weiterer wichtiger spezifischer photophysikalischer Parameter, der ebenfalls von den Ratenkonstanten der radiativen und nicht radiativen Relaxationspfade eines angeregten Elektrons abhängig ist (siehe Gleichung 3), ist die Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ).

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

Die Fluoreszenzlebenszeit gibt dabei die mittlere Verweildauer eines Elektron im angeregten Zustand an, bevor es durch radiative Energieabgabe wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Diese Zeit ist ausschlaggebend für weitere photophysikalische Phänomene, da u. a. bei langer Verweildauer im angeregtem Zustand auch die Wahrscheinlichkeit weiterer Relaxationspfade ansteigt, die zur radiativen Relaxation konkurrierend sind. Darüber hinaus sind die Ratenkonstanten  $k_r$  und  $k_{nr}$  und damit die Fluoreszenzquantenausbeute und -lebenszeit stark von der Umgebung des Fluorophores abhängig. So kann die Relaxation eines Elektrons durch weitere Moleküle oder Fluorophore in der unmittelbaren Umgebung beeinflusst werden. Des Weiteren hat auch das Lösungsmittel, in dem sich das fluoreszenzfähige Molekül befindet, direkten Einfluss auf die Schwingungsniveaus der Elektronenzustände, sowie auf die Dipolorientierung und -bewegung des Fluorophores, was sich damit ebenfalls auf die photophysikalischen Eigenschaften dessen auswirkt.

### **2.1.3 Energieübertragungspfade und Farbstoffinteraktionen**

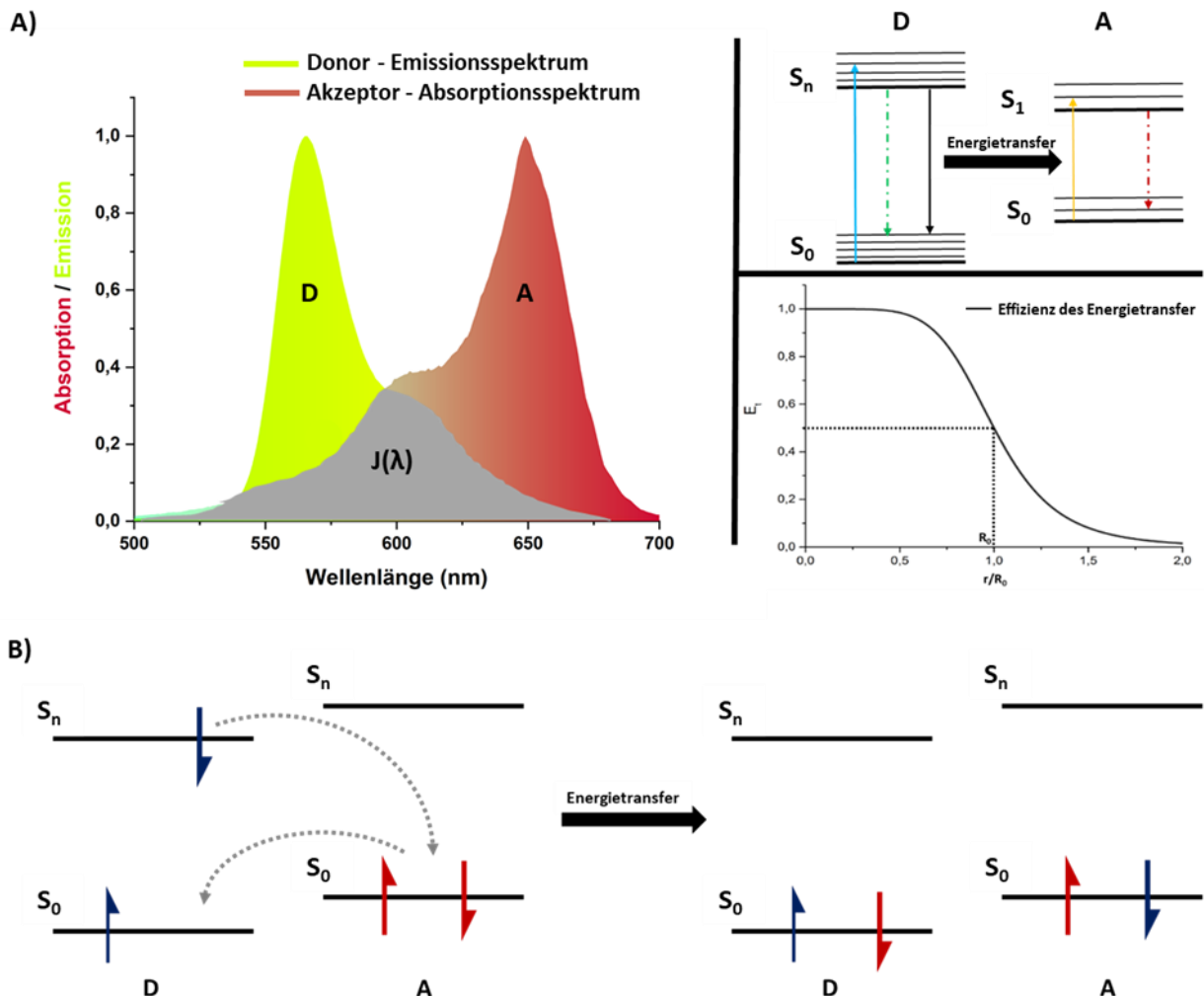
Das Phänomen der Fluoreszenzlöschung ist ein wichtiger Bestandteil photophysikalischer Methoden und Anwendungen. Dies kann einerseits vorteilhaft sein und zunutze gemacht werden, beispielsweise um Moleküldynamiken oder Kolokalisationen auf molekularer Ebene zu analysieren und wird auch in der hochauflösenden Mikroskopie angewandt. Andererseits kann dieses Phänomen auch ein unerwünschter Effekt sein, der, anders als zuvor erwähnt, für die hochauflösende Mikroskopie nachteilhaft sein kann. Als Fluoreszenzlöschung werden dabei Prozesse bezeichnet, die aktiv dazu beitragen, dass das angeregte Fluorophor strahlungslos in den Grundzustand übergeht, oder verhindern, dass das Fluorophor angeregt werden kann, ohne das fluoreszenzfähige Molekül zu zerstören. Dabei interagiert das Fluorophor meist mit weiteren Molekülen, wobei das angeregte Molekül, das seine Energie überträgt, häufig als Donor (D) und das Molekül, auf das diese Energie übertragen wird, häufig als Akzeptor (A) bezeichnet wird. Diese Löschungsprozesse können allgemein in dynamische- und statische Löschungsereignisse bzw. Komplexbildungen unterteilt werden. Bei den dynamischen Prozessen wird die Energie durch stochastisches Zusammenstoßen des Fluorophores mit einem geeigneten Löschmolekül übertragen. Daher wird diese Variante der Fluoreszenzlöschung häufig auch als Stoßlöschung bezeichnet. Dieses Phänomen ist diffusionsabhängig, kann aber auch durch Konformationsänderungen des angeregten Moleküls begünstigt bzw. ausgelöst werden. Der

Prozess der statischen Löschung beruht dabei nicht auf Diffusion oder Kollision mit einem geeigneten Molekül, sondern auf der reversiblen Komplexbildung zwischen Akzeptor- und Donormolekül, wobei auch absorptions- und fluoreszenzunfähige Komplexe entstehen können, wenn beide Moleküle im Grundzustand interagieren. Des Weiteren können auch oftmals Kombinationen aus den genannten Lösungsprozessen oder spezielle Lösereignisse auftreten. Durch diese Prozesse kann  $k_{nr}$  in Gleichung 2 und Gleichung 3 unterteilt werden und damit um die Ratenkonstante  $k_q$  ( $q$  für Löschung, engl.: quenching) erweitert werden. Zu den erwähnten speziellen Relaxationswege, bei der die angeregte Energie strahlungslos auf weitere fluoreszenzfähige Moleküle übertragen wird, die die aufgenommene Energie radiativ abgeben können, zählt beispielsweise der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), bei dem die Energieübertragung strahlungslos durch Dipolwechselwirkungen der Fluorophore stattfindet, oder der photoinduzierte Elektronentransfer (PET), bei dem Elektron direkt zwischen den beteiligten Molekülen ausgetauscht werden. Diese speziellen Energieübertragungspfade sind in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt. Der Resonanzenergietransfer tritt dabei auf, wenn geeignete fluoreszenzfähige Moleküle in räumliche Nähe kommen. Für dieses Ereignis sind die möglichen Zustände eines Elektrons der beteiligten Moleküle von großer Bedeutung. Die Schwingungsniveaus der beteiligten Moleküle sollten ausreichend kohärent sein, was sich mithilfe der Spektren der beteiligten Moleküle ablesen und berechnen lässt. So muss das Emissionsspektrum des Donormoleküls ausreichend gut mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, was durch das Überlappungsintegral ( $J(\lambda)$ ) angegeben und berechnet werden kann (Abb. 3 (A)). Des Weiteren ist die Dipolorientierung bzw. der Winkel ( $\kappa^2$ ) zwischen den Dipolen, sowie die Distanz zwischen den beteiligten Molekülen ausschlaggebend. Allgemein kann dieses Phänomen, je nach Eigenschaften der beteiligten fluoreszenzfähigen Moleküle, zwischen 2 – 10 nm auftreten. Bei ausreichend hoher Überlappung der Spektren der Moleküle, kann der räumliche Abstand der Moleküle durchaus auch bei 10 nm liegen, damit dieses Phänomen auftritt. Als aussagekräftigen Faktor für die Fähigkeit und die Effizienz des Resonanzenergietransfers zweier Fluorophore, kann der Förster-Radius berechnet werden. Dieser gibt an, ab welcher räumlichen Distanz der beteiligten Moleküle die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt (Abb. 3 (A)). Aus diesem Radius kann die Effizienz des Energietransfers für verschiedene Distanzen der beteiligten Moleküle oder umgekehrt, der tatsächliche Abstand der beteiligten Moleküle aus der Effizienz des Energietransfers berechnet werden. Sind die beschriebenen Faktoren ausreichend gegeben, dann kann die Energie des



aneregten Donormolekül strahlungslos an das Akzeptormolekül übertragen werden, das die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz abgeben kann (Abb. 3 (A)).

Ein Weiteres spezielles Phänomen der Energieübertragung ist der photoinduzierte Elektronentransfer (Abb. 3 (B)). Dabei müssen die Orbitale der geeigneten beteiligten Moleküle ausreichend überlappen, sodass die Elektronen zwischen dem angeregten Molekül und dem Akzeptormolekül ausgetauscht werden können (Abb. 3 (B)). Dies ist ab einen räumlichen Abstand der beteiligten Moleküle von  $\sim 1$  nm gegeben. Dabei kann entweder ein oxidativer oder reduktiver Pfad der Elektronenübertragung stattfinden. In beiden Fällen liegen die beteiligten Moleküle temporär als radikale Formen vor, da sie entweder ein Elektron zu viel oder ein Elektron zu wenig besitzen.

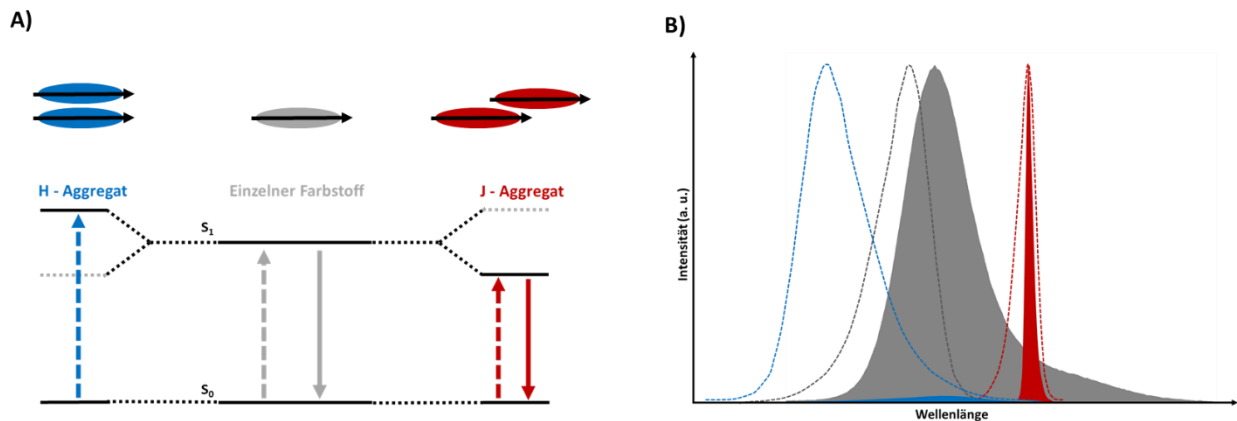


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfer und photoinduzierten – Elektronentransfers.** A) Nötige Voraussetzungen für den abstandsabhängigen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) sind überlappende Spektren der Emission des Donorfarbstoffes (D) und der Absorption des Akzeptorfarbstoffes (A). Der Grad der Überlappung bzw. das Überlappungsintegral ( $J(\lambda)$ ) der Spektren kann mathematisch berechnet und bestimmt werden. Bei ausreichender Überschneidung der jeweiligen Spektren besteht die Wahrscheinlichkeit, dass durch Resonanzeffekte der Donorfarbstoff (D) strahlungsfrei in seinen Grundzustand übergeht (schwarzer Pfeil) und der Akzeptorfarbstoff (A) in einen angeregten Zustand überführt wird (gelber Pfeil),

dessen Relaxation in der Emission eines Photons resultieren kann (roter Pfeil) . Durch das Überlappungsintegral kann weiterfolgend auch die Wahrscheinlichkeit der abstandsabhängigen Energieübertragung der zwei beteiligten Farbstoffe berechnet werden und somit auf die Distanz zwischen Akzeptor und Donor geschlossen werden. B) Darstellung zwei beteiligter Farbstoffe, bestehend aus Donormolekül (D) und Akzeptormolekül (A), bei denen, bei Orbitalüberlappung ( $< 1\text{nm}$  Distanz zwischen den beteiligten Molekülen), der Austausch von angeregten Elektron des Donormolekül auf das Akzeptormolekül stattfindet. Dabei sind die Elektronen, im Hinblick auf ihren Eigendrehimpuls, als blaue Halbpfeile (Donor) bzw. rote Halbpfeile (Akzeptor) dargestellt. Je nach beteiligtem Molekül und Energieniveau, kann dieser Prozess oxidativ bzw. reduktiv ablaufen, da kurzzeitig die beteiligten Moleküle bzw. Atome einen Elektronenüberschuss bzw. -unterschuss besitzen. Nach erfolgtem Elektronentransfer wurde jeweils ein Elektron des Donors mit einem Elektron des Akzeptors getauscht, daher besitzen hier der  $S_0$ -Zustände der jeweiligen Moleküle nach dem Elektronentransfer jeweils einen blauen und einen roten Halbpfeil.

In der hochauflösenden Mikroskopie werden, wie bereits erwähnt, häufig Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt und zelluläre Strukturen somit markiert. Dabei werden geeignete Antikörper mit Farbstoff markiert. Hierbei ist nicht kontrollierbar an welcher Position und wie viele Farbstoffe an einem Antikörper gekoppelt werden. Bei hoher Farbstoffkopplungsdichte besteht allerdings die Wahrscheinlichkeit, dass Farbstoffe aggregieren, was sich in Folge dessen negativ auf die Fluoreszenzfähigkeit der Farbstoffe und damit auf die Qualität hochauflösender Aufnahmen auswirken kann. Dabei ist literaturbekannt, dass gewisse Farbstoffe, wenn sie sich in unmittelbare räumliche Nähe befinden, dazu tendieren, Aggregate aus genau definierten Anordnungen zu bilden. Im Falle einer Farbstoffaggregation entstehen nach DAVIDOV, aufgrund von Dipolwechselwirkungen, aus einem angeregtem Elektronenenergieniveau, mehrere mögliche Energieniveaus, die je nach Anordnung der Dipole der Farbstoffe, bevorzugt eingenommen werden können (Abb. 4 (A)). So ist es einerseits wahrscheinlich, dass sich Farbstoffe parallel im Bezug auf ihren Dipol ausrichten können, was dazu führt, dass sich das bevorzugte Energieniveau des angeregten Zustandes erhöht. Dies hat einen hypsochromen Effekt im Bezug auf das Absorptionsspektrum der Farbstoffe zur Folge (Abb. 4 (B)). Des Weiteren ist hier die Emission der Farbstoffe unterdrückt und findet kaum statt (Abb. 4 (B)). Diese Aggregate werden H-Aggregate oder H-Dimere (hypsochrom (H)) genannt. Andererseits ist es auch möglich, dass sich Farbstoffe, im Bezug auf ihren Dipolmoment, hintereinander in gleicher Orientierung ausrichten (Abb. 4 (A)). Dabei sinkt das bevorzugte Energieniveau des angeregten Zustandes ab, was sich in einen bathochromen Effekt des Absorptionsspektrums bemerkbar macht (Abb. 4 (B)). Hierbei ist besonders, dass das Absorptionsspektrum schmal und symmetrisch ist, da wenige bis keine vibronischen Zwischenniveaus existieren (Abb. 4 (B)). Dies macht sich auch im Emissionsspektrum bemerkbar, das komplett mit dem Absorptionsspektrum überlagert, wodurch

keine Stokesverschiebung zu beobachten ist (Abb. 4 (B)). Diese Form der Farbstoffaggregationen werden J-Aggregate oder J-Dimere (Jelley (J)) genannt.



**Abbildung 4: Farbstoffaggregatsformen und ihre Auswirkung auf das Absorptions- und Emissionsverhalten.** A) Mögliche Aggregatsformen, bestehend aus einer parallelen Anordnung (H-Aggregate, blau) der beteiligten Farbstoffe oder einer angereichten Anordnung (J-Aggregate, rot), im Bezug auf die jeweiligen Dipolmomente (schwarze Pfeile) und die daraus resultierenden Energieniveaus der Aggregate, im Vergleich zu einem einzelnen Farbstoff (grau). Hierbei sind grau hinterlegte Energieniveaus des  $S_1$  – Zustandes der jeweiligen Aggregatformen nicht erlaubt und finden nicht statt. B) Die aus den Energieniveaus in A) resultierenden Absorptionsspektren (gepunktete Linie) und Emissionsspektren (eingefärbte Fläche) der jeweilige H-Aggregate (blau) und J-Aggregate (rot), sowie dem einfachen Farbstoff (grau). Im Vergleich zum einzelnen Farbstoff zeigen H-Aggregate ein zu niedrigeren Wellenlängen verschobenes Absorptionsspektrum, sowie ein stark reduziertes Emissionsspektrum bzw. minimales Emissionsspektrum, wohingegen J-Aggregate ein zu höheren Wellenlängen verschobenes deckungsgleiches symmetrisches Absorptions- und scharfes Emissionsspektrum zeigen.

Eine dieser Farbstoffklassen, die zur Bildung solcher Farbstoffaggregate neigen, sind beispielsweise Cyanine. Diese Farbstoffklasse wird auch, aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften, bevorzugt bei der hochauflösenden Mikroskopiemethode *d*STORM eingesetzt.

## 2.2 Fluoreszenzmikroskopie

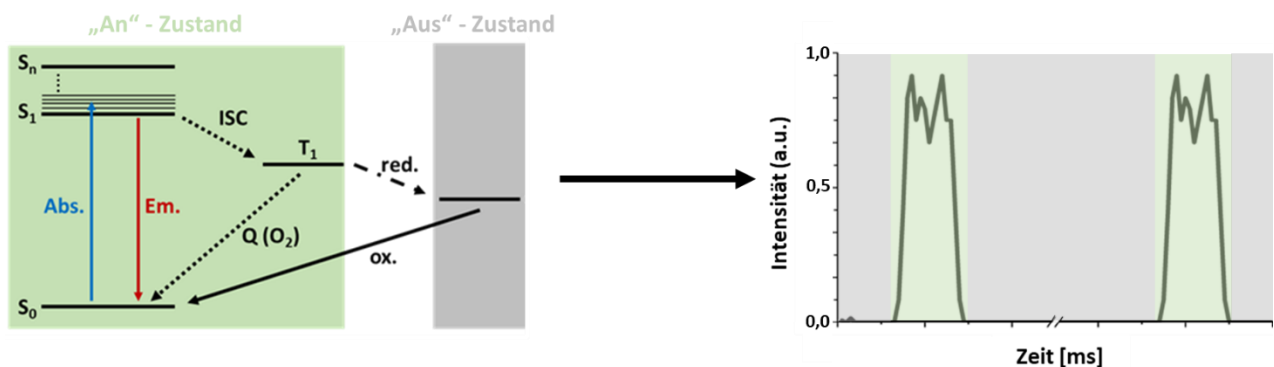
In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit wichtigen und verwendeten Methoden *d*STORM und Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie genauer beschrieben und das Prinzip dieser Mikroskopiemethoden theoretisch beleuchtet.

### 2.2.1 Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie *d*STORM

Die Weitfeldmethode *d*STORM basiert auf dem stochastischen reversiblen Photoschalten von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen, sowie dem mathematischen Lokalisieren des Massenzentrums der einzelnen Punktspreizfunktionen (PSF) der Emitter [15, 16, 45]. Wie bereits

erwähnt ist die Punktspreizfunktion eines Emitters von den optischen Komponenten, sowie der emittierenden Wellenlänge des Fluorophores abhängig. Für eine präzise Bestimmung des Massenzentrums der PSF, und somit für eine präzise Lokalisierung des Emitters, sollten die Punktspreizfunktionen nicht mit denen anderer Emitter überlappen und damit vereinzelt vorliegen. Dies kann, wie in Abbildung 5 dargestellt, durch Additive im Puffersystem ermöglicht und kontrolliert werden. Geeignete Fluorophore, wie beispielsweise Cyanine, können durch diese Additive photochemisch zu einem Schaltprozess gezwungen werden. Bei diesem Prozess werden die geeigneten Fluorophore mit einer spezifischen Ratenkonstante ( $k$ ) zwischen einem fluoreszierenden „An“-Zustand ( $k_{AN}$ ) und einem nicht fluoreszierenden „Aus“-Zustand ( $k_{AUS}$ ) überführt [15, 16, 46]. Bei einem ausreichend guten Verhältnis zwischen  $k_{AN}$  und  $k_{AUS}$  steigt die Wahrscheinlichkeit, dass nur ein kleiner Teile der Fluorophore in einem fluoreszenzfähigen „An“-Zustand vorliegen und somit sinkt auch die Wahrscheinlichkeit überlappender Punktspreizfunktionen der Emitter. Die Dauer des fluoreszierenden „An“-Zustands (ms) ist im Vergleich zum nicht fluoreszierenden „Aus“-Zustand (s) um ein Vielfaches geringer. Der Mechanismus des Schaltens der Fluorophore wird durch Reduktionsmittel und der Belichtungsintensitäts des Anregungsquelle bestimmt, und damit chemisch und physikalisch induziert und kontrolliert [15, 16]. Dabei beruht dieses Phänomen darauf, dass die zugeführten Reduktionsmittel, beispielsweise Thiole, mit einem Fluorophor, das sich im Triplettzustand befindet, reagieren können und das Fluorophor so in einen nicht fluoreszenzfähigen Zustand befördern [15, 16]. Dabei können u. a. radikale Formen des Fluorophores, sowie Thiyl-Radikale entstehen [15, 16]. Das radikalische fluoreszenzunfähige Fluorophor kann mit molekularen Sauerstoff reagieren, was dazu führt, dass das Fluorophore wieder in den fluoreszenzfähigen Grundzustand überführt wird [15, 16]. Das radikalische Fluorophore ist gegenüber oxidativen Prozessen sehr stabil, was dazu führt, dass die Lebenszeit des nicht fluoreszenzfähigen Emitters im Sekundenbereich liegt [15, 16]. Die Bildung dieser radikalischen Formen ist dabei nur für Rhodaminfarbstoffe oder Oxazine gültig [15, 16]. Cyaninfarbstoffe werden durch Thiole direkt an der konjugierten Doppelbindung angegriffen und bilden ein Thioladdukt [15, 16]. Diese Reaktion der Cyanine mit Thiolen überführt die Farbstoffe in den nicht fluoreszenzfähigen Zustand [15, 16]. Diese Farbstoffe können dennoch durch oxidative Prozesse wieder zurück in den fluoreszenzfähigen Grundzustand überführt werden [15, 16]. Eine vereinfachte Form des Schaltmechanismus für Cyaninfarbstoffe ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Da das photophysikalische Phänomen der Interkombination (ISC) sehr unwahrscheinlich ist, sind

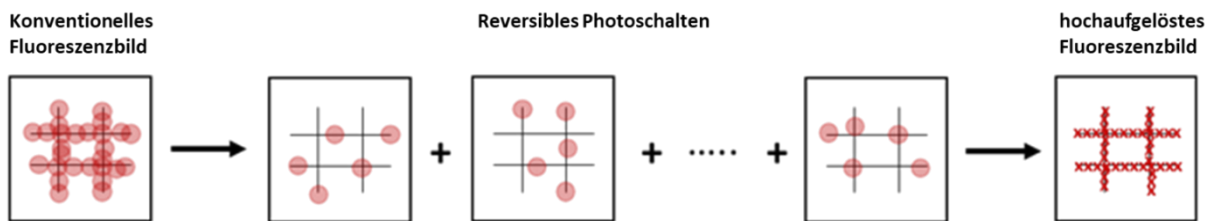
mehrere Tausende Anregungszyklen nötig, damit die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs in den Triplettzustand gegeben ist. Dieser Triplettzustand kann dabei aber nicht nur durch Thiole reduziert werden, sondern auch mit Sauerstoff reagieren und oxidiert werden, sodass das Fluorophor wieder in den Grundzustand überführt wird. Somit kann die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff in der Lösung hinderlich für diese Methode sein, da die Oxidation des Triplettzustands eine Konkurrenzreaktion zur Thiolreaktion ist, und somit die Überführung des Farbstoffes in den nicht fluoreszenzfähigen „Aus“-Zustand verhindern, was sich wiederum negativ auf die Schaltraten und somit auf die Qualität des hochaufgelösten Bildes auswirkt. Daher besteht die Möglichkeit die Konzentration des molekularen Sauerstoffs in Lösung durch Zugabe eines enzymatischen Systems, bestehend aus Glukoseoxidase, Katalase und Glukose, zu verringern und somit die zur Thiolreaktion konkurrierenden Oxidation des Triplettzustandes zu minimieren [49].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Blinkmechanismus von Cyaninfarbstoffen und die daraus resultierenden zeitlichen Intensitätsspurten.** Energiediagramm der Elektronenzustände des angeregten Elektrons, das nach mehreren Anregungszyklen eine Änderung seines Eigendrehimpuls erfahren kann und damit einen Übergang in den Triplettzustand  $T_1$ . Dieser Zustand kann entweder durch molekularen Sauerstoff in den  $S_0$ -Zustand oxidiert werden oder durch Thiole in einen absorptions- und emissionsunfähigen Zustand reduktiv überführt werden. Dieser Zustand kann wiederum durch molekularen Sauerstoff oxidiert werden und damit zurück in den  $S_0$ -Zustand überführt werden. Durch enzymatischen Entzug von molekularem Sauerstoff kann die Lebenszeit dieses absorptions- und emissionsunfähigen Zustandes verlängert werden. Aus diesem chemischen Mechanismus resultiert ein Blinkverhalten des betrachteten Farbstoffmoleküls, bestehend aus einem kurzlebigen absorptions- und emissionsfähigen „Anzustand“ (grün) (Millisekundenbereich) und einem langlebigeren reduzierten absorptions- und emissionsunfähigen „Auszustand“ (grau) (Sekundenbereich).

Neben einem ausreichend guten Schaltverhalten der Fluorophore sollte für eine hohe Auflösung aber auch die Zielstrukturmarkierungsdichte ausreichend hoch sein. Nach dem NYQUIST-SHANNON Theorem sollte die mittlere Distanz zwischen den Markierungen bzw. den Emittlern, mindestens die Hälfte der gewünschten Auflösung entsprechen [15, 47, 48]. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass jedes Fluorophor, mit dem die gewünschte Zielstruktur markiert ist, auch mindestens einmal in einem fluoreszenten Anzustand war, müssen ausreichend viele Einzelbilder (mehrere Tausend) mit einer entsprechenden Detektor, meist eine EM-CCD Kamera (engl.:

electronic multiplying charged coupled device), aufgenommen werden. Nach erfolgter Aufnahme mehrerer Tausend Einzelbilder, können spezielle Programme, wie beispielsweise rapidSTORM<sup>1</sup> oder ThunderSTORM<sup>2</sup>, für die Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bildes benutzt werden [45, 50]. Hierbei wird eine geeignete mathematischer Funktionen, beispielsweise eine Bessel- oder Gausfunktion, an jede PSF angelegt und so der Masseschwerpunkt eines jeden Emitters für jedes Einzelbild bestimmt und diese Koordinate in ein Datenblatt eingetragen. Daraus resultiert, nach Berechnung aller Einzelbilder, ein hochaufgelöstes rekonstruiertes Bild ( $\sim 10 - 20$  nm Auflösung) der aufgenommenen Struktur, mit einen gewissen Fehler, der aufgrund der Ungenauigkeiten des Bestimmens des Masseschwerpunktes durch die mathematische Funktion einhergeht. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6: Funktionsprinzip der Mikroskopiemethode dSTORM.** Durch den in Abb. 5 thematisierten chemischen Mechanismus des Farbstoffblinkens wird durch Pufferzusätze erreicht, dass sich nur ein kleiner Teil der strukturmarkierten Farbstoffe (rot) in einem absorptions- und emissionsfähigen „Anzustand“ befindet. Durch ausreichend lage Aufnahmen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit sichergestellt werden, dass das Blinken eines einzelnen Farbstoffes in mehreren Einzelbildern detektiert wird. Durch automatisierte Nachbearbeitung der Einzelbilder kann durch mathematische Annäherung der Punktspreizfunktion der emittierenden Farbstoffe (rot), das Zentrum dessen, mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern bestimmt werden und hierdurch eine präzise Rekonstruktion der farbstoffmarkierten Struktur, mit einer Auflösung von wenigen Nanometern, erzielt werden.

Diese Lokalisationsgenauigkeit ( $\sigma_{lok}$ ), bzw. Lokalisationsungenauigkeit kann mithilfe der Gleichung 4 nach MORTENSEN berechnet werden [51].

$$\sigma_{Lok}^2 = \frac{\sigma_{PSF}^2 + \frac{a^2}{12}}{N} \left( \frac{16}{9} + \frac{8\pi \left( \sigma_{PSF}^2 + \frac{a^2}{12} \right) b^2}{Na^2} \right) \quad (4)$$

Wobei  $\sigma_{PSF}^2$  die Standardabweichung der PSF,  $a$  die Pixelgröße,  $b$  die Standardabweichung der Hintergrundphotonen, und  $N$  die Anzahl der vom Fluorophor emittierten Photonen ist. Die erreichte Auflösung kann strukturell mithilfe einer Fourier-Ringkorrelation (engl.: fourier ring correlation (FRC)) oder durch das multiplizieren der in Gleichung 4 errechneten Lokalisationsgenauigkeit mit dem Faktor  $2\sqrt{2\ln(2)}$  bestimmt werden. Die

<sup>1</sup> <https://github.com/stevewolter/rapidstorm>

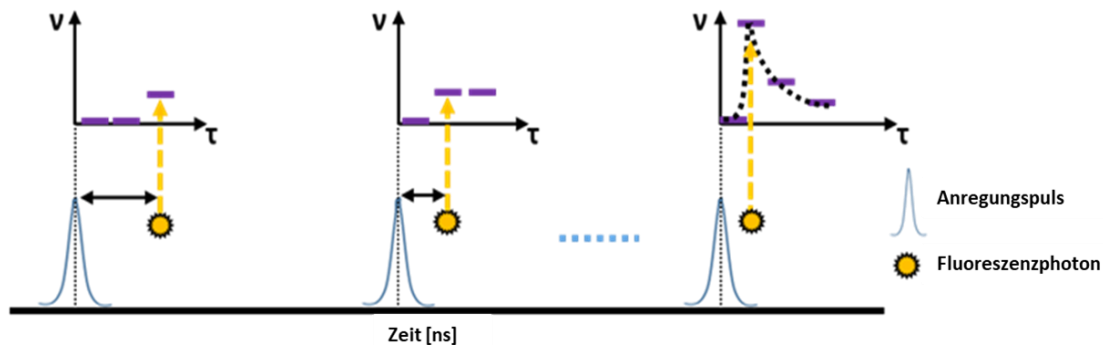
<sup>2</sup> <https://github.com/zitmen/thunderstorm>

Lokalisationsgenauigkeit ( $\sigma_{\text{lok}}$ ) eines jeden Emitters ist dabei überwiegend von der Standardabweichung der mathematischen Funktion beim Bestimmen des Massenschwerpunktes und der Anzahl der eingefangenen Photonen eines jeden Emitters abhängig. Somit kann, zumindest theoretisch gesehen, die Auflösung eines so rekonstruierten Bildes unendlich hoch sein, wenn die Anzahl der eingesammelten emittierten Photonen unbegrenzt hoch ist. In der Praxis ist dies nicht der Fall, erlaubt aber die Idee eines sogenannten Superemitters, der, ähnlich wie der Photosyntheseapparat der Pflanzen, als Lichtsammelkomplex agiert und damit die Energie mehrerer angeregter Farbstoffe sammelt und gebündelt emittiert.

### **2.2.2 Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie & Photonenkoinzidenzen**

Neben der Anzahl der emittierten Photonen, kann als Fluoreszenzmikroskopieparameter auch die Lebenszeit der Emitter verwendet werden. Dabei ist vor allem die zeitliche Komponente der Fluoreszenz (siehe Abschnitt 2.1.2) von Bedeutung. Hierfür ist ein spezieller technischer Aufbau des Mikroskops vorausgesetzt, sowie spezielle Lawinenphotodioden als Detektoren (engl.: „single-photon avalanche diode“, kurz SPAD), die einzelne Photonen registrieren können. Bei einem solchen Aufbau können beispielsweise mehrere Fluoreszenzanalysemethoden verbunden werden. So wurde in dieser Arbeit u. a. ein Mikroskop verwendet, das aus einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop besteht, kombiniert mit dem Aufbau der speziellen Spektroskopiemethode der „zeitlich korrelierten Einzelphotonenzählung“ (engl.: „time correlated single photon counting“, kurz TCSPC). Das Prinzip der TCSPC-Methode ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Dabei wird bei dieser speziellen Spektroskopiemethode meistens eine, in einer gewissen Frequenz gepulste Lichtquelle verwendet, die zur Anregung der Fluorophore genutzt wird. Diese Lichtquelle ist hierbei über spezielle Elektronik mit dem bzw. den Detektor(en) synchronisiert. Dies führt dazu, dass der bzw. die Detektoren, zeitlich registrieren, wann ein Lichtquellenpuls ausgesendet wird, was als „Startsignal“ für die zeitliche Registrierung einzelner, am Detektor ankommender Photonen, dienen kann. Um ausreichend Statistik zu generieren und damit aussagekräftige Analysen der speziellen Lebenszeit der Fluorophore durchzuführen, werden dabei tausende von einzelnen Photonen gezählt. Klassisch gesehen kann dabei eine Messung der Fluoreszenzlebenszeit mit diesem Aufbau in mehrere kleinere Teilmessungen unterteilt werden. Wobei das Aussenden eines jeden Lichtquellenpulses von dem bzw. den

Detektor(en) als „Startsignal“ und die Ankunft der emittierten Photonen als „Stoppsignal“ für die zeitliche Bestimmung genutzt werden kann.

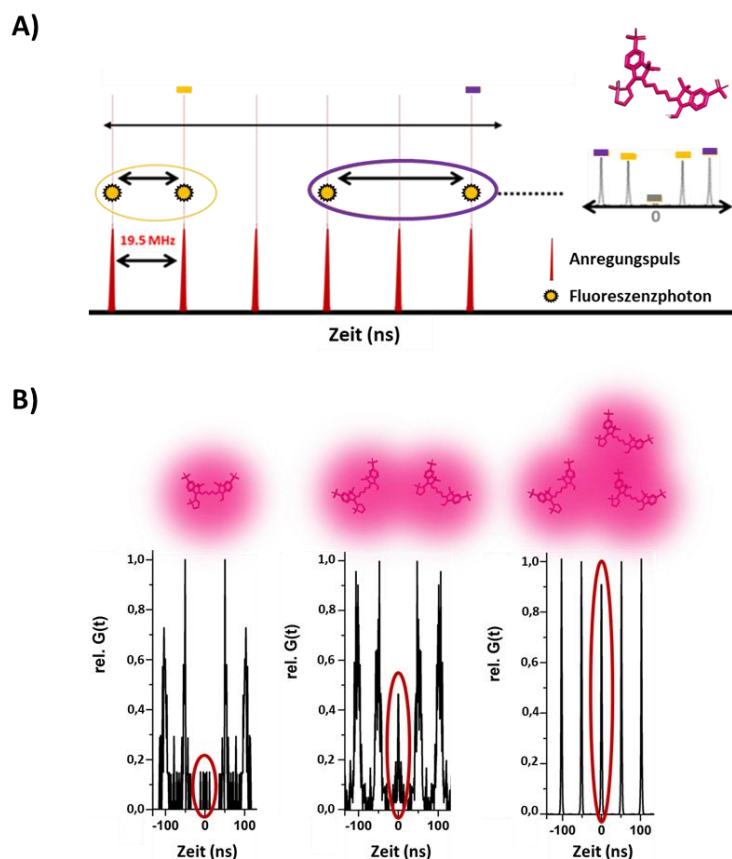


**Abbildung 7: Funktionsprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählungsmethode.** Diese Methode ist charakterisiert durch Synchronisation repetitiver Anregungspulse (blaue) mit einzelphotonensensitiven Detektoren, die ankommende Fluoreszenzphotonen (gelb) zählen und durch spezifische Analyseprogramme in zeitliche Klassen einteilt (lila Balken im Diagramm). Wobei  $v$  hier die Häufigkeit der jeweiligen eingeteilten Photonenkategorie und  $\tau$  die Zeit in ns darstellt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis eine signifikante Anzahl an Fluoreszenzphotonen registriert wurden, was in einer farbstoffspezifischen Abklingfunktion der Fluoreszenzlebensdauer resultiert (schwarz gepunktete Verteilung im Graph). Für die charakteristische Berechnung der Fluoreszenzlebenszeit kann dabei nicht nur die zeitliche Abhängigkeit von Anregungspuls und erstem ankommendem Fluoreszenzphoton dienen, sondern auch die Zeit zum nächsten Anregungspuls genutzt werden. Neuere Technologien der Elektronik erreichen mittlerweile eine geringere „Todzeit“ der Detektoren, sowie eine minimale „Todzeit“ für die Verrechnung, sodass mehrere Fluoreszenzphotonen nach Anregung detektiert und gezählt werden können, was zu einer präziseren Wiedergabe der charakteristischen farbstoffspezifischen Fluoreszenzlebenszeit führt.

In Kombination mit einem rasterfähigen konfokalen Fluoreszenzmikroskop, kann eine gewisse Region, einer mit Fluoreszenzfarbstoff markierten biologischen Probe, abgefahren werden und die Information der farbstoffspezifischen Fluoreszenzlebenszeit ausgelesen werden. Durch das geringe Anregungsvolumen (einige Femtoliter ( $10^{-15}$  L)) können hierbei auch einzelne Fluorophore, beispielsweise einer Einzelmoleküloberfläche, angesteuert werden und die zeitliche Fluoreszenzinformation ausgelesen werden. Mit diesem Aufbau kann darüber hinaus aber nicht nur die fluorophorspezifische Ankunftszeit der Photonen, in Abhängigkeit zum synchronisierten Anregungspuls gemessen werden, sondern, mit einer simplen Modifikation der elektronischen Anschlüsse, auch die zeitliche Information zwischen den verschiedenen Photonenankunftszeiten bestimmt werden. Diese relativ einfache Modifikation ermöglicht es, Aussagen über die Anzahl der im geringen Anregungsvolumen aktiv emittierenden Fluorophore zu treffen. Durch die Möglichkeit der Zählung der aktiv emittierenden Fluorophore, können auch Rückschlüsse über Farbstoffinteraktionen gezogen werden, und diese genauer analysiert werden. Der Aufbau, der diese Methode ermöglicht, ähnelt dabei dem Aufbau der TCSPC Einheit in Abbildung 8, mit dem Unterschied, dass nicht die Lichtquelle mit den Detektoren synchronisiert ist, sondern die



Detektoren untereinander verknüpft sind. Dies ermöglicht es, den zeitlichen Unterschied zwischen zwei ankommenden Photonen zu bestimmen, wobei die Ankunft des ersten Photons an einem Detektor als „Startsignal“ und die Ankunft eines weiteren Photons am zweiten Detektor als „Stoppsignal“ genutzt wird. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei darauf, dass ein einzelner Farbstoff, beim Übergang vom angeregten Zustand in seinen Grundzustand, diese Energie in Form der Emission eines einzelnen Photons abgibt. Somit kann ein einzelner Farbstoff nicht simultan mehrere Photonen aussenden, sondern benötigt eine gewisse Zeit, im Mittel die spezifische Fluoreszenzlebenszeit dieses Fluorophores, um erneut angeregt werden zu können und diese Energie in Form eines weiteren Photons abzugeben. Bei zwei oder mehreren, unabhängig voneinander aktiven Fluorophoren, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehrere emittierte Photonen zeitgleich an den Detektoren registriert werden, was zu einem simultanen „Start“- und „Stoppsignal“ führt. Eine schematische Darstellung dieser besonderen Methode ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Funktionsprinzip der Photonenkoinzidenzmessung.** A) Diese Methode ist charakterisiert durch die Synchronisation einzelphotonensensitiver Detektoren, die ankommende Fluoreszenzphotonen (gelb) zählen und durch spezifische Analyseprogramme in zeitliche Klassen einteilt (farbige Balken im Diagramm). Dabei wird das konfokale Anregungsvolumen auf einen immobilisierten Farbstoffpunkt auf der Probenoberfläche geparkt und zeitlich solange beobachtet, bis eine signifikante Anzahl an Fluoreszenzphotonen detektiert wurde, oder dieser Farbstoff photozerstört wurde. Dabei kann bei einem einzelnen Farbstoff (magenta Struktur, Cyanine 5) nur ein Fluoreszenzphoton an einem der beiden synchronisierten Detektoren registriert und nie zwei simultane

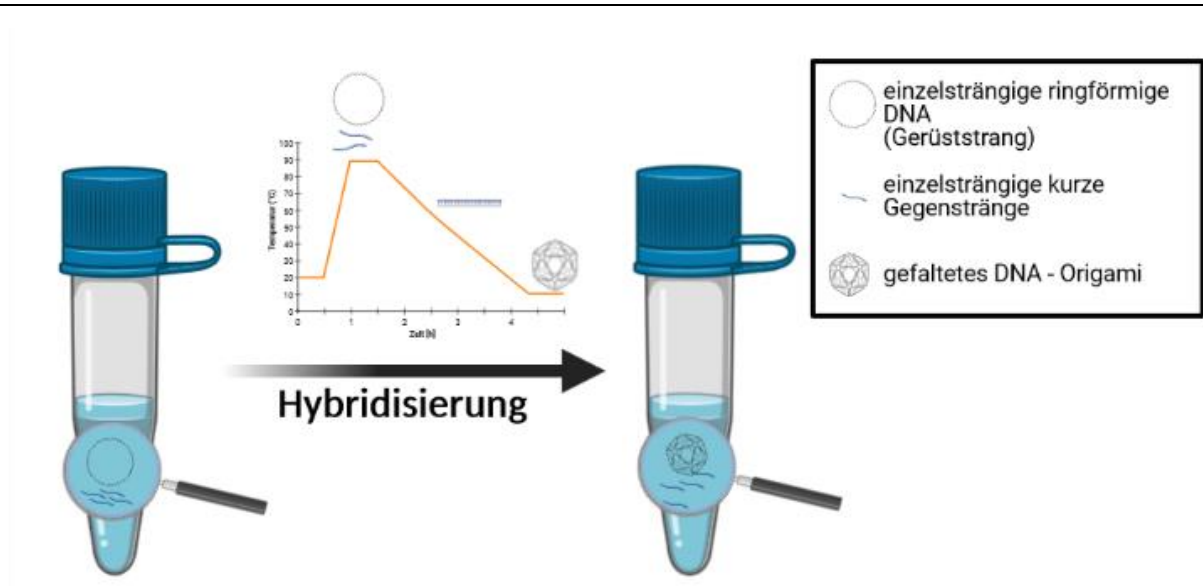
Fluoreszenzphotonen dieses Farbstoffes registriert werden, was dazu führt, dass das Maximum zum Zeitpunkt  $t=0$  (grauer Balken), bis auf stochastische Hintergrundphotonen, nahe 0 ist. Erst ein nächster Anregungspuls (rote Maxima) bietet die Wahrscheinlichkeit, dass der zweite synchronisierte Detektor ein Fluoreszenzphoton registriert, was zu einem Stoppsignal der Teilmessung führt und zu einer Berechnung der benötigten Zeit zwischen ersten und zweiten ankommenden Fluoreszenzphoton (gelbe, violette Umrandung). B) Zu erwartende Photonenkoinzidenzgraphen diverser Anzahlen von Farbstoffen im konfokalen Fokus. Dabei ist das signifikante Maximum zum Zeitpunkt  $t=0$  rot umrandet. Ein einzelner Farbstoff führt zu einem niedrigen Signal zum Zeitpunkt  $t=0$ , wohingegen die Wahrscheinlichkeit simultan ankommender Fluoreszenzphotonen an den synchronisierten Detektoren bei zwei Farbstoffen im Fokus ansteigt und ein Maximum zum Zeitpunkt  $t=0$  von ca. 0,5 zu erwarten ist. Bei drei und mehr Farbstoffen im konfokalen Fokus ist die Wahrscheinlichkeit simultan registrierter Fluoreszenzphotonen hoch, was zu einer starken Ausprägung des Maximum zum Zeitpunkt  $t=0$  führen würde.

Diese spezielle Methode ermöglicht es somit, mögliche Koinzidenzen der emittierten Photonen zu bestimmen und damit die aktiven Emitter im Anregungsvolumen zu bestimmen. Diese Zählmethode wird auch als „Photonenbunching“, für das gebündelte Registrieren mehrerer Photonen, bzw. „Photonenantibunching“, für das nicht gebündelte Registrieren der Photonen an den Detektoren, bezeichnet.

### 2.3 DNA-Origami

In der Natur dient die Desoxyribonukleinsäure (DNS), oftmals kurz als DNA (engl.: deoxyribonucleic acid) abgekürzt, im Allgemeinen als Informationsträger und Erbmaterial. Die DNA enthält damit alle wichtigen Daten und Baupläne, um eine(n) funktionsfähige Zelle oder Organismus zu bilden. Diese Informationen werden dabei durch Zellteilung von der Elternzelle auf die Tochterzelle übertragen und weitergegeben. Der strukturelle Aufbau der Desoxyribonukleinsäure ist seit den Arbeiten von J. D. WATSON und F. H. C. CRICK im Jahre 1953 detailliert verstanden [52]. So ist die DNA aus einem negativ geladenen Zuckerrückrad, bestehend aus Desoxyribose, und einer Abfolge von Pyrimidin- (Cytosin (C) und Thymin (T)) und Purinbasen (Guanin (G) und Adenin (A)) aufgebaut [52]. Ein einzelner Baustein der DNA wird dabei als Nukleotid bezeichnet, das aus einem Furanosering mit Phosphatsäurerest und einer Base besteht. Dabei wechselwirken Pyrimidinbasen mit Purinbasen über Wasserstoffbrückenbindungen. So bilden die Basen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen, und die Basen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Durch diese Wechselwirkung, komplementärer DNA Regionen, bildet sich eine helikale doppelsträngige Struktur aus, die als Doppelhelix bezeichnet wird. Dabei beträgt der Abstand und der Winkel zwischen aufeinanderfolgenden Basen  $\sim 0.35$  nm und  $\sim 36^\circ$ . Somit durchläuft eine DNA-Doppelhelix nach 10 Basen eine komplette Drehung bzw.

Windung. Durch die stabile Struktur und den detailliert verstandenen Aufbau der DNA, kann diese aber auch als Werkzeug genutzt werden, bei dem präzise Dimensionen erforderlich sind. Neben der Möglichkeit der präzisen Berechnung der Dimensionen und Winkel, eignet sich DNA auch aufgrund der relativ simplen Handhabung und Modifizierbarkeit. So kann durch eine DNA „de novo“ Synthese, jeder beliebige DNA Einzelstrang individuell hergestellt werden. Des Weiteren können auch modifizierte Nukleotide verwendet werden, die entweder chemische Gruppen tragen können, um weitere Modifikationen durchzuführen, oder mit Farbstoff markiert sind, beispielsweise für die Fluoreszenzmikroskopie. So hat sich die DNA in den modernen Wissenschaften auch als molekulares Lineal, u. a. auch in der Fluoreszenzmikroskopie, etabliert, da die Dimension der verwendeten DNA relativ einfach und exakt berechnet werden kann. Neben der Nutzung der DNA als zweidimensionales Lineale, etablierte PAUL ROTHEMUND 2006 eine weitere Methode, DNA als Baustein für komplexe und präzise zwei- und/oder dreidimensionale Konstrukte zu nutzen [53]. Hierbei werden lange einzelsträngige DNA-Sequenzen, meist einzelsträngige ringförmige Bakteriophagen-DNA, als Ausgangsstrang bzw. Gerüststrang (engl.: scaffold) genutzt. Dieser Gerüststrang wird mithilfe von kurzen Oligonukleotidsträngen (engl.: staple strands), die zu bestimmten Sequenzabschnitten des Gerüststranges komplementär sind, in eine gewünschte Struktur geformt. Dabei ist die Sequenz der Oligonukleotide nicht komplementär zu einer durchgehenden Basenabfolge des Gerüststranges, sondern diese komplementäre Sequenz ist aufgeteilt auf mehrere nicht aufeinanderfolgende Abschnitte des Gerüststranges, sodass ein Oligonukleotide mehrere Bereiche des Gerüststranges binden kann und diese in räumliche Nähe bringt. Durch das komplementäre Hybridisieren hunderter kurzer individueller Oligonukleotide, mit verschiedenen Abschnitten des Gerüststranges, wird dieser in die gewünschte Form gebracht. Eine schematische Abbildung der Vorgehensweise und des Prinzipz von DNA-Origami ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei hat jeder Oligonukleotid eine spezifische Schmelztemperatur, bei der die Hälfte der Stränge hybridisiert vorliegen. Diese Schmelztemperatur ist abhängig von der jeweiligen Anzahl der potenziellen Wasserstoffbrückenbindungen und damit ausschlaggebend vom jeweiligen Guanin- und Cytosinegehalt der Sequenz. Daher wird für die Herstellung von DNA-Origami, je nach Sequenzen ein individuelles thermisches Protokoll der Hybridisierung des DNA-Konstruktes erstellt.



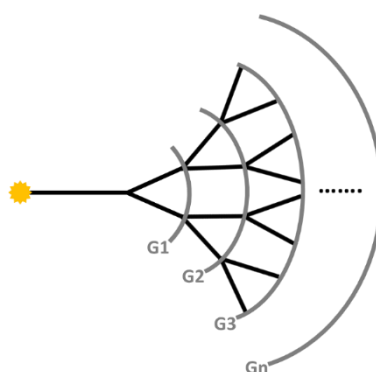
**Abbildung 9: Schemata der Konstruktion von DNA basierenden Hilfsstrukturen mittels DNA-Origami.** Ausgangspunkt dieser Technik ist eine einzelsträngige, oftmals ringförmige, DNA – Sequenz. Diese einzelsträngige Sequenz dient als Gerüststrang des zu bildenden DNA-Konstrukts. Mithilfe eine Vielzahl an kurzen einzelsträngigen Gegenstränge, deren nötigen Sequenzen mit geeigneten Computerprogrammen automatisiert berechnet werden können, kann das gewünschte DNA-Konstrukt unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen (u. a. Ionenkonzentration, pH-Wert, Temperaturgradient) in einem Reaktionsgefäß gebildet werden. Abbildung erstellt in BioRender.

Der Name dieser Methode ist dabei in Anlehnung an die japanische Papierfaltkunst gewählt, daher wird die Hybridisierung bzw. Herstellung eines DNA-Origami Konstrukt häufig auch als Faltung bezeichnet. Darüber hinaus ist es auch hier möglich modifizierte Oligonukleotide zu verwenden, was den gefalteten DNA-Origami den Zugang für ein breites Spektrum an Anwendungen, beispielsweise der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie, ermöglicht. Die Berechnung der nötigen kurzen Oligosequenzen sowie das Design des gewünschten DNA-Origamis kann dabei mithilfe einer Vielzahl gut etablierter Computerprogramme erleichtert und beschleunigt werden. Die jeweilige optimale Hybridisierungsbedingung des individuell berechneten DNA-Origami, bestehend aus einem optimalen thermischen Hybridisierungsprotokolls und optimalen Hybridisierungspufferzusammensetzungen, muss dabei experimentell bestimmt und individuell angepasst werden.

## 2.4 Dendronsysteme

Die in diesem Kapitel beschriebene organische Struktur, sowie chemische Synthese wurden der Lehliteratur entnommen und können im Detail, für das weitere Verständnis, dort nachgelesen und vertieft werden [26].

Ein Dendron (altgriechisch: thenthron „Baum“) ähnelnd in seinem strukturellen Aufbau, wie sein Name schon verrät, der schematischen Struktur des sichtbaren Teil eines Baumes. Dabei können die Verästelungen dieser Struktur, in der Theorie, chemisch beliebig oft erweitert werden. Hierbei entstehen beliebig große Moleküle, die beliebig stark verzweigt sein können. In Abbildung 10 ist ein schematischer Aufbau der Grundstrukturen eines Dendrons gezeigt.



**Abbildung 10: Vereinfachte Struktur und Aufbau eines Dendronsystems.** Die schwarzen Linien repräsentieren die organischen Ketten und Verzweigungen der Dendronstruktur. In gelb ist dabei die funktionelle Gruppe im aktiven Zentrum des Dendrons dargestellt. Die grauen Begrenzungslinien zeigen die diversen Generationen des Dendrons nach den jeweiligen repetitiven Reaktionen an (G1-Gn), wobei jede der repetitiven Reaktionsrunden zu einer Verdopplung der Verzweigungen führt. Das Ende einer jeden Verzweigung eines gewünschten mehrfach verzweigten Dendrons kann mit weiteren reaktiven Gruppen, oder direkt mit Farbstoffen modifiziert sein. Der Aufbau des Dendrons ist hier vereinfacht in zweidimensionaler Struktur dargestellt.

Im Gegensatz zu einem Dendrimer, das im Prinzip einen kreisförmigen bzw. kugelförmigen Aufbau besitzt und ebenso beliebig oft verzweigt sein kann, besitzt ein Dendron ein „aktives Zentrum“, das mit einer funktionellen Gruppe modifiziert werden kann, sodass das gesamte Dendron chemisch an eine beliebige Interessensstruktur gekoppelt werden kann. Von diesem Punkt ausgehend, verästelt sich das Dendron über beliebig viele Seitenketten, sodass makroskopisch gesehen ein Halbkreis bzw. eine Halbkugel entsteht. Am Ende dieser Verästelungen können wiederum funktionelle Gruppen gekoppelt sein, die sich von der funktionellen Gruppe im „aktiven Zentrum“ unterscheiden kann, sodass hier weitere Strukturen oder Moleküle gekoppelt werden können, wie beispielsweise Farbstoffe.

---

Chemisch betrachtet erfolgt die Synthese eines Dendrons in mehreren sequentiellen Schritten. Dabei kann diese sowohl divergent erfolgen und die baumartige Struktur somit, ausgehend vom „aktiven Zentrum“, sequentiell in mehreren Schritten und Reaktionen erweitert werden, als auch konvergent erfolgen und damit zuerst die Verästelungen über mehrere chemische Reaktionen aufgebaut werden, die dann an das „aktive Zentrum“ verankert werden. Darüber hinaus wird bei einer konvergenten Synthese meist mit chemischen Schutzgruppen gearbeitet, die die funktionellen bzw. reaktiven Gruppen vor einer unerwünschten Reaktion bzw. Abreaktion dieser schützen. Häufig werden kommerzielle Dendrons als Polyamidoamine-Strukturen (PAMAM) angeboten. Dabei tragen die funktionellen Gruppen der Verästelungen ein Amin, das wiederum beispielsweise mit Methyl-Acrylaten reagieren kann und somit zwei Ester am Ende der Verästelung gebildet werden kann. Diese Ester können in einem Weiteren Schritt mit Diaminen reagieren, wobei hierdurch wiederum ein terminales Amin an der Verästelung entsteht. Hierbei können beliebig lange, und damit aus beliebig vielen Kohlenstoffatomen bestehende, Diamine benutzt werden. Durch diese Amin-Ester-Amin Bildung, können Dendrone beliebig oft erweitert werden, wobei ein Durchlauf dieser Reaktionen bzw. ein Erweiterungsschritt die Generation der Dendrone und damit die Größe angibt. So wird Generation 0 (G0) beispielsweise meist als Ausgangspunkt beschrieben, Generation 1 (G1) als Dendron nach der ersten Reaktionsrunde, Generation 2 (G2) nach der zweiten Reaktionsrunde etc., wobei sich die Verzweigungen nach jeder Reaktionsrunde verdoppeln. Dieser Reaktionsmechanismus bildet dabei nur eine Möglichkeit der chemischen Synthese von Dendronen. Darüber hinaus gibt es ein breites Spektrum an diversen Dendronen, die einer anderen chemischen Aufbau unterliegen, beispielsweise Polylysine-Dendrone [8,9,10], Poly-Aminosäure-Dendrone oder aromatische-polyether-Dendrone um nur einen Teil zu nennen [54, 55, 56, 57, 58, 59].

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Ensemblespektroskopie**

In diesem Unterkapitel sind alle technischen Geräte aufgelistet, die dazu verwendet wurden um die photophysikalischen Eigenschaften diverser Proben einer Vielzahl an Farbstoffen oder farbstoffmarkierten Molekülen in Lösung (Ensemble) zu analysieren.

##### **3.1.1 Absorptions- und Emissionspektroskopie**

Die Absorptionsmessungen der Proben wurde an einem UV-Vis Spektrometer (V650, Jasco Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt, das eine Deuteriumlampe und eine Halogenlampe besitzt, um für Messungen den Spektralbereich von 190 – 326nm sowie 326 – 900 nm abzudecken. Für präzise Messungen der optischen Dichte (OD) und damit des Absorptionsverhaltens, wurden die Konzentrationen der Probenlösungen so gewählt, dass die Absorptionsmaxima im Bereich von 0,1 bis maximal 1 OD lagen, um probenspezifische Verfälschungen des Absorptionsverhaltens, durch Interaktion der zu untersuchenden Moleküle, zu vermeiden.

Alle Emissionsmessungen wurden an einem Spektrofluorometer (FP-6500, Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt, das eine Xenonlampe als Anregungslichtquelle besitzt, um einen spektralen Bereich von 200 – 900 nm abzudecken. Für adequate Messungen wurde der Monochromator des Fluorometers und die Beschleunigungsspannung des Photomultiplier so eingestellt, dass die gemessenen Emissionswerte im Bereich zwischen 100 – 1000 lagen und damit unterhalb der Sättigung des Detektors. Diese Einstellungen wurden für die jeweiligen Messreihen zum Vergleich der jeweiligen Proben gleich gelassen.

Alle Messungen wurden in einer 50 µl Quartzglasküvette (Hellma, 105.251-QS) mit einer Schichtdicke von 0,3 cm durchgeführt.

##### **3.1.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen**

Alle Anisotropiemessungen wurden an einem Spektrofluorometer (FP-6500, Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden sowohl im Anregungsstrahlengang, als auch im Emissionsdetektionsweg Polarisatoren (Thorlabs, LPVISE

100-A) eingebaut. Die Anregungswellenlänge wurde auf 640 nm eingestellt und die Detektion bei 670 nm durchgeführt. Dabei wurde die Spaltbreite für das Anregungs- und Emissionslichtes auf 3 – 10 nm eingestellt. Die Sensitivität des Detektors wurde dabei auf das schwächste Polarisations signals (horizontale Anregung und horizontale Detektion ( $I_{HH}$ )) so eingestellt, dass das registrierte Signal zwischen 100 und 500 amplifizierten Photonen lag. Die Fluoreszenz anisotropie im Gleichgewichtszustand ( $r$ ) der jeweiligen Proben wurde dabei nach Gleichung 5 und 6 berechnet.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (5)$$

Wobei sich  $I$  auf die jeweilige Intensität des Signals und die jeweiligen Indizes auf die Polarisationsrichtung ( $V$  für vertikal,  $H$  für horizontal) des Anregungslichts (jeweils erster Index) bzw. des Emissionslichts (jeweils letzter Index) bezieht. Hierbei stellt  $G$  einen Korrekturfaktor des Systems, aufgrund unterschiedlicher Polarisations sensitivitäten des Detektors, dar. Dieser Korrekturfaktor kann, wie in Gleichung 6, bestimmt werden.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

Die jeweiligen Polarisationsrichtungen wurden für jede Probe jeweils bis zu 5x gemessen.

### 3.1.3 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählungsspektroskopie (TCSPC)

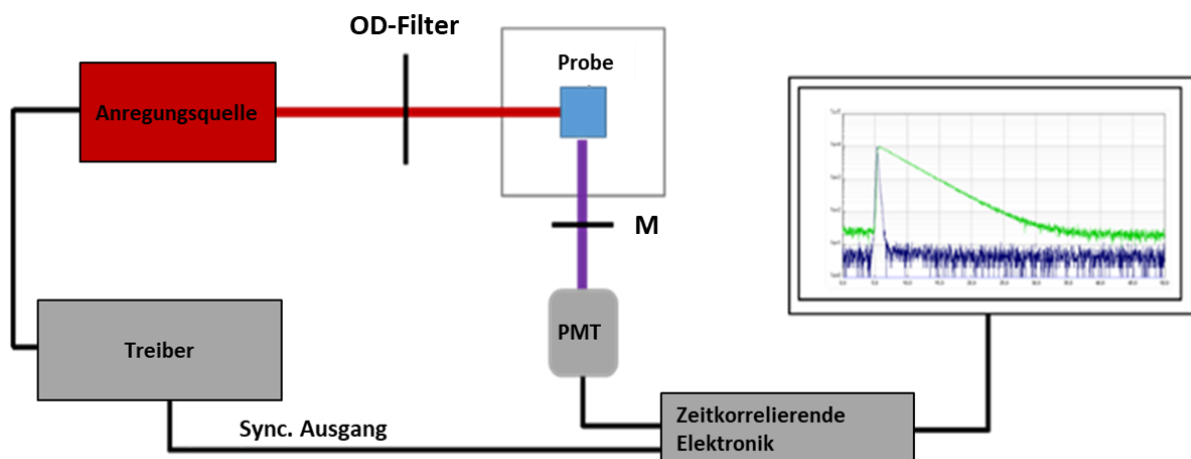
Der Messaufbau für die Fluoreszenzlebenszeitbestimmung einer Ensemble-Probenlösung ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Für diese Technik wurde eine 637 nm Laserdiode (Picoquant) benutzt, der über die Elektronik mit einer Photodiode (engl.: photomultiplier tube, PMT) als Detektor synchronisiert wurde. Für die Messungen wurde jeweils eine Repetitionsrate bzw. Pulsfrequenz der Laserdiode von 20 MHz benutzt, was einen Abstand von 50 ns zwischen den Anregungspulsen entspricht. Diese Parameter wurden über das Lasermodulkontrollpanel Sepia II (Picoquant) eingestellt. Über das Messprogramm PicoHarp (Picoquant) wurde eine zeitliche Auflösung von 8 ps eingestellt, sowie ein Ende der Messung nach 5.000 s oder nach Registrierung von 10.000 Photonen. Über einen Filter der optischen Dichte und damit der Anregungsleistung wurde eine Zählrate von 1.000 Photonen pro Sekunde manuell eingestellt. Alle Ensemble-Messungen wurden in einer 50  $\mu$ l Quarzglaszküvette (Hellma, 105.251-QS) mit einer Schichtdicke von 0,3 cm durchgeführt. Zu



Beginn einer jeweiligen Messreihe wurde die Instrumentenfunktion und damit der Gerätefehler bzw. die Gerätekonstante bestimmt. Hierfür wurde eine Streulösung (Lutox) verwendet, die auf ca. 1000 Streumoleküle pro ml in vollentsalztem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verdünnt wurde. Für diese Messung wurde der Monochromator vor der Photodiode auf die Anregungswellenlänge von 637 nm eingestellt. Für die Messung der jeweiligen Farbstoffprobenlösung wurde der Monochromator auf die Wellenlänge des Emissionsmaximums eingestellt. Die gemessenen Daten wurden mithilfe des Auswerteprogramms FluoFit (Picoquant) analysiert und die spezifische Fluoreszenzlebenszeit mithilfe des nachfolgenden Exponentialfunktion (Gleichung 7) berechnet.

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (7)$$

Diese Gleichung integriert alle zeitlichen eingeteilten Photonenklassen unter Berücksichtigung der Gerätefunktion (IRF). Bei komplexeren Farbstoffverhalten muss die Exponentialfunktion angepasst werden, um die Abklingfunktion besser zu beschreiben, hierbei wird die einfache Exponentialfunktion um mehrere Exponenten erweitert. Zu beachten ist, dass beim mathematischen Beschreiben der gemessenen spezifischen Abklingfunktion der Anpassungsfehler ( $\chi^2$ ) nahe 1 liegt und damit auch die Schwankung des Fehlers über die gesamte Spanne der Anpassung an die Abklingfunktion nahe dem Nullwert liegt.



**Abbildung 11: Aufbau der Messvorrichtung der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung.** Die Anregungslichtquelle (rote Box) ist über den Anregunglichttreiber mit der Zeitschaltelektronik synchronisiert. Dies resultiert in einer Synchronität der Photodiode (PMT) und der gepulsten Anregungslichtquelle. Über einen Filter der optischen Dichte lässt sich die Anregungsleistung manuell regulieren. Über einen Monochromator (M) lässt sich die spezifische Emissionswellenlänge der zu untersuchenden Probe einstellen. Die Auswertung der detektierten zeitlichen Photonenzählung lässt sich durch geeignete Computerprogramme und mathematische Funktionen berechnen, wobei der blaue Graph die Instrumentenfunktion (IRF) beschreibt und der grüne Graph die gemessene spezifische Fluoreszenzlebenszeit.

### 3.1.4 Langzeitemissionsmessungen

Für die Analyse des Emissionsverhalten über die Zeit wurde eine Küvettenhalterung so gebaut und justiert, dass mehrere Anregungslaserlinien von 532 nm (Linos, NANO250.532-100), 568 nm (Coherent, Sapphire-568\_100CW\_CDRH) und 641 nm (Toptica, iBEAM smart\_640S\_11598) zur Messung verwendet werden konnten. Hierbei wurden die verschiedenen Laserlinien über eine Linse auf eine 50 µl Quartzglasküvette (Hellma, 105.251-QS) mit einer Schichtdicke von 0,3 cm fokussiert. Zur Messung verschiedener Proben, wurden diese in diversen Puffern auf eine Konzentration von ~ 10 µM verdünnt. Als verwendete Puffer diente u.a. eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, Sigma, D8537-500ML), mit oder ohne 100 mM β-Mercaptoethylamin (MEA-HCl; Sigma, M6500-25G), 50 mM Ascorbinsäure (Sigma, 26,855-6), ein enzymatisches Sauerstoffentzugssystem bestehend aus 5% D-Glukose (Sigma, 47829) mit 200 Einheiten / ml Katalase (Sigma, C100) und 11 Einheiten / ml Glukoseoxidase, PBS (Sigma, D8537-500ML) mit 10 µM Erythrosin B (Sigma, 200964-5 G) oder 1 M 3-(Cyclohexylamino)-2-Hydroxy-1-Propansulfonsäure (CAPSO) (CarlRoth, 5584.2). Der pH-Wert der Puffersysteme wurde jeweils mit Kaliumhydroxid (KOH, Sigma, 221473-25 G) eingestellt. Die Emission der Probenlösung wurde hinter einem geeigneten Emissionsfilter (Langpass oder Bandpass) mithilfe eines Glasfaserspektrometers (Ocean Optics, USB2000) und dem Computerprogramm SpectraSuite (Ocean Optics, Version 1.0162) detektiert.

### 3.1.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Alle Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen wurden an einem Aufbau, bestehend aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert 100 TV), einem Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan Achromat, 63x, NA 1.4) und einem 640 nm Diodenlaser (Coherent Cube). Über einen Strahlteiler (Omega Optics 645DLRP) wurde der Anregungsstrahl in das Öobjektiv und in die Probe umgeleitet. Die jeweiligen Proben wurden auf eine Konzentration von ≤ 1 nM in Phosphatpuffer verdünnt, auf ein Objektträger mit zentraler Vertiefung (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) überführt und mit einem Deckglas (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 0107242) versiegelt. Die Proben temperatur wurde während der Messung, über eine externe Wasserkühlung, auf 25 °C gehalten. Die Anregungsleistung wurde jeweils auf 400 µW eingestellt. Das Fluoreszenzlicht des konfokalen Anregungsvolumens wurde über einen 50/50 Strahlteiler (Linos) und über ein Glasfaserkabel an die jeweiligen

Avalanche Photodioden (APD) (Perkin Elmer, SPCM-AQRH-14-FC) weitergeleitet. Durch eine Korrelationskarte (ALV-5000/60X0 Multiple Tau Digital Real Correlator) wurden die jeweiligen Signale abgeglichen und mit einer spezifischen Software (ALV-Correlator Software, V.3.0) verrechnet. Für jede Probe wurden jeweils drei Autokorrelationsfunktionen für 5 Minuten aufgenommen und Mittelwert für die Analyse und den Vergleich der Daten gebildet.

## **3.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Im Folgenden werden alle fluoreszenzmikroskopischen Aufbauten und Anwendung, die für diese Arbeit benutzt wurden, beschrieben.

### **3.2.1 Mikroskopaufbau für *d*STORM und DNA -PAINT**

Alle Messungen wurden an einem, nach eigenen Spezifikationen, angefertigten Aufbau durchgeführt. Dieser setzt sich aus einem inversen Weitfeldmikroskop (IX-71, Olympus), bestehend aus einem Ölimmersionsobjektiv (Olympus, APON 60XOTIRF, NA 1.49), einem Objektivrevolver (IX2-NPS, Olympus) und diversen Strahlteilern (HC560/659, HC410/504/582/669, Semrock) um das Anregungslicht und Fluoreszenzlicht zu separieren. Für die Anregung der Proben dienten u.a. mehrere Anregungslichtquellen (Cube 640-100C, Genesis MX 639, Genesis MX 561, Cube 405-100C, Sapphire-568\_100CW\_CDRH, Coherent; NANO250.532-100, Linos) in Kombination mit jeweilig spezifischen Anregungssäuberungsfiltern (Laser Clean-up filter 640/10, 561/10, 405/20, Chroma). Der Anregungslaser wurde über diverse Linsen auf die hintere Brennebene der Objektives fokussiert. Die Messungen wurden in diversen Illuminationsmodi gemessen (siehe jeweilige Proben und Abschnitte). Des Weiteren konnte, für Messungen mit zirkular polarisiertem Anregungslicht, eine  $\lambda/4$ -Platte (Thorlabs, SAQWP05M) in den Anregungsstrahlengang eingebaut werden. Das Fluoreszenzlicht wurde über geeignete Bandpass- oder Langpassfilter (HC697/75, LP647, FF01-679/41-25, FF01-835/70, Semrock; HC 679/41, HQ610/75, Chroma) spektral gefiltert und über EMCCD (engl.: "electron-multiplying charge coupled device") (iXon DU-897, Andor) registriert. Für die jeweiligen Aufnahmen wurden einheitliche Aufnahmezeiten benutzt und die jeweilige Anzahl der aufzunehmenden Einzelbilder, berechnet aus der Länge der Aufnahmezeit und der verwendeten Integrationszeit der Kamera,

angepasst. Für die jeweiligen Aufnahmen wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Anregungsleistung von  $\sim 2.5 \text{ kW/cm}^2$  benutzt. Für *d*STORM-Messungen ist eine spezielle Pufferzusammensetzung bestehend aus 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA, Sigma-Aldrich) in PBS (Sigma-Aldrich, D8537-500ML) mit einem mit Kaliumhydroxid eingestellten pH-Wert von  $\sim 7,4$ , nötig. Zusätzlich dazu wurden auch Messungen durchgeführt, die neben dieser Pufferzusammensetzung und diesem pH-Wert, auch ein enzymatisches Sauerstoffreduktionssystem, bestehend aus 5 % (w/v) D-Glukose, 11 U/ml Glukoseoxidase und 200 U/ml Katalase, beinhalteten. Des Weiteren wurden auch Messungen nur in PBS, ohne zusätzliche Additive durchgeführt, bzw. auch anderer Puffer, bestehend aus 1 M 3-(Cyclohexylamino)-2-Hydroxy-1-Propansulfonsäure (CAPSO) (CarlRoth, 5584.2) oder 10 mM L-Histidin (Merck, H8000) verwendet.

Alle Messungen wurden entweder mit rapidSTORM3.3 oder mit ThunderSTORM analysiert [45, 60]. Die Lokalisationsgenauigkeit wurde nach MORTENSEN berechnet [51]. Die bilbasierende Auflösung wurde über eine Implementierung in ImageJ mithilfe einer Fourier-Ringkorrelation (FRC) mit einem Schwellenwert von  $1/7$  abgeschätzt [61, 62].

### 3.2.2 Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie und Photonenkoinzidenzkonfiguration

Alle bildgebenden Fluoreszenzlebenszeitmessungen, zeitlichen Einzelmolekül – Intensitätsspuren und Photonenkoinzidenzmessungen wurden an einem MicroTime200 System (PicoQuant, Berlin, Deutschland) durchgeführt, bestehend aus einem FLIMbee Galvanoscanner (PicoQuant, Berlin, Deutschland), einem inversen Fluoreszenzmikroskop (IX83, Olympus) mit einem Ölimmersionsobjektiv (60x, NA 1,45, Olympus), zwei einzelphotonensensitiven Photodioden (engl.: “single photon avalanche photodiode”, SPAD) (Excelitas Technologies, 75154 K3, 75154 L6) und einem TimeHarp300 Mehrkanal-Speichermodul (PicoQuant, Berlin, Deutschland). Über ein Glasfaserkabel (NKT photonics, SuperK FD PM, A502-010-110) wurde eine Weißlichtlaserlichtquelle (NKT photonics, superK extreme) für eine gepulste Anregung in das MicroTime200 – System gekoppelt. Alle Messungen wurden mit einem  $100 \mu\text{m}$  Lochblende (engl.: “pinhole”) durchgeführt. Über einen 50/50 Strahlteiler (PicoQuant, Berlin, Deutschland) wurde das Emissionlicht auf die beiden Detektoren aufgeteilt und abgelenkt. Um mögliche Fehlerquellen, beispielsweise durch Lichtreflexe, Anregungsstreulicht oder dem Effekt des Nachglühens der Detektoren, zu

verringern, wurden vor den jeweiligen Detektoren zwei identische Bandpassfilter (ET700/75 M, Semrock) platziert. Alle Messungen wurden mit dem Computerprogramm SymPhoTime64 (PicoQuant, Berlin, Deutschland) durchgeführt und ausgewertet. Vor Beginn einer jeden Messreihe wurde, mithilfe einer Farbstofflösung, die Lochblende auf ihre Position überprüft. Hierzu wurde das zeitliche Intensitätssignal an den beiden Detektoren überprüft und auf die maximale Detektionsrate, über die Lochblendenjustageschrauben, eingestellt. Des Weiteren wurden vor jedem Messtag die beiden Detektoren zeitlich aufeinander abgestimmt und angeglichen. Alle Messungen wurden mit zirkular polarisiertem Licht durchgeführt. Alle bildgebenden Fluoreszenzlebenszeitmessungen und zeitlichen Einzelmolekül – Intensitätsspuren wurden mit einer Laserleistung von  $\sim 0.5 - 2,5 \text{ kW/cm}^2$  im T3-Modus mit einer zeitlichen Auflösung von 25ps durchgeführt. Die Energieübertragungseffizienzen ( $E$ ) der DNA-Origami Konstrukte wurde nach Gleichung 8 berechnet:

$$E = 1 - \frac{\tau_2}{\tau_1} \quad (8)$$

Hierbei wurde die Fluoreszenzlebenszeiten des 18 nm DNA-Origami Konstruktes mit einer monoexponentiellen Anpassung und alle weiteren mehrfach markierten DNA-Origami Konstrukte mit einer biexponentiellen Anpassung aus den entsprechenden Intensitätstrajektoren der DNA-Origami Konstrukte bestimmt. Die erste Fluoreszenzlebenszeitkomponente ( $\tau_1$ ) wurde dabei auf die Fluoreszenzlebenszeit des 18 nm DNA-Origami Konstruktes festgesetzt. Durch Entfernen des Synchronisationskabels am Computersteckplatz und einstecken des Detektorkabels des zweiten Detektors an diesen Steckplatz, wurde eine Konfiguration des Systems für Photonenkoinzidenzmessungen erreicht. Alle Messungen des Photonenkoinzidenzsignals wurden mit dieser Konfiguration im T2-Modus durchgeführt. Hierbei wurde als Photostabilisation ein Puffersystem mit Trolox/Troloxquinon, ein wasserlösliches Derivat des Vitamin E (Sigma-Aldrich, 238813), in PBS (Sigma-Aldrich, D8537-500ML), pH  $\sim 7,4$ , verwendet. Daneben wurden ebenso Photoschaltpuffer, bestehend aus 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA, Sigma-Aldrich) in PBS (Sigma-Aldrich, D8537-500ML), pH  $\sim 7,4$ , verwendet.

Für die Analyse der Photonenkoinzidenzhistogramme wurde der Mittelwert des Maximums zum Zeitpunkt  $t = 0$  aus dem Mittelwert der jeweiligen ersten vier Nebenmaxima zum Maxima zum Zeitpunkt  $t = 0$  berechnet.

### **3.3 Herstellung von DNA-Origami Konstrukten**

Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Entwicklung, Herstellung und Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Origami Konstrukte beschrieben. Dabei wurde nach der standardisierten Vorgehensweise verfahren [63].

#### **3.3.1 Computerbasierte Gestaltung des DNA-Origami**

Für die Gestaltung des DNA-Origami Konstruktes wurde das Computerprogramm caDNAno 2.2.0 verwendet [64, 65]. Dieses Programm kann, wie in dieser Arbeit genutzt, für eine dreidimensionale Visualisierung des DNA-Origami Konstruktes in das 3D-Visualisierungs- und Animationsprogramm Autodesk Maya 2012 implementiert werden. Für die Gestaltung des DNA-Origami wurde die Gitternetzstruktur in caDNAno 2.2.0 verwendet. Durch das jeweilige Anklicken der gewünschten Gitternetzpunkte kann ein beliebiges Muster erzeugt werden, dass synchron auch als dreidimensionale Struktur erscheint. Ist die gewünschte Struktur gestaltet, kann die jeweilige DNA-Gerüststrangsequenz ausgewählt werden. Für die Konstruktion der DNA-Origami wurde die zirkulare einzelsträngige Bakteriophagen-DNA p7560 aus einem M13mp18 Derivat (tilibit nanosystems, M1-32) verwendet. Die nötigen einzelsträngigen Gegenstränge, um den Gerüststrang in die gestaltete Struktur zu überführen, können automatisiert berechnet und ausgegeben werden, dennoch ist eine manuelle Überprüfung der jeweiligen Gegenstränge im Hinblick auf die Hybridisierungslänge und -stellen erforderlich. Nach erfolgter Überprüfung können alle mittels caDNAno 2.2.0 gestalteten DNA-Origami Konstrukte und einzelne Sequenzen, sowie hybridisierte Sequenzen, in diversen Dateiformaten für die Weiterverarbeitung exportiert werden.

#### **3.3.2 Stabilitätssimulation des DNA-Origami**

Die mechanische Stabilität des gestalteten DNA-Origami Konstrukts kann mithilfe der online-Plattform CanDO berechnet und vorhergesagt werden [66, 67]. Hierzu können die jeweiligen zuvor abgespeicherten DNA-Sequenzen ausgewählt und hochgeladen werden. Des Weiteren können DNA spezifische Parameter wie Biegungswinkel, Basenabstand, und Basenwinkel angepasst und abgeändert oder die eingespeicherten Standardparameter beibehalten werden. Nach erfolgreicher Berechnung erhält der Benutzer eine elektronische Mail mit allen

Ergebnissen der Berechnungen, sowie eine Heatmap und Animationen der Stabilität des berechneten DNA-Origami Konstrukts. Bei ungenügender Stabilität können an der DNA-Origami Struktur und den jeweiligen Sequenzen Nachbesserungen mithilfe der Gestaltungssoftware caDNAo 2.2.0 vorgenommen werden und die Stabilität erneut berechnet werden.

### 3.3.3 Hybridisierung des DNA-Origami

Alle Farbstoff- oder TCO-modifizierten Oligonukleotidsequenzen wurden bei der biomers.net GmbH bestellt. Alle Biotin-modifizierten Sequenzen wurden bei SigmaAldrich Inc. bestellt. Alle unmodifizierten Oligonukleotide wurden bei der Merck KGaA bestellt. Die einzelsträngige Gerüstsequenz p7560 wurde bei tilibit bestellt (tilibit nanosystems, M1-32). Sämtliche für die DNA-Origami Konstrukte nötigen Sequenzen sind im Anhang aufgelistet.

Die Hybridisierung des gestalteter DNA-Origami Konstrukte erfolgte durch einen Temperaturgradienten von 90 °C – 4 °C mit -1 °C/min in 200 µl Reaktionsgefäßen (A. Hartenstein, RK02) zu je 50 µl Reaktionslösung. Die Hybridisierung wurde in einem ThermoCycler (C1000 Thermal Cycler, BioRad) durchgeführt. Der DNA-Origami Hybridisierungspuffer setzte sich in seiner finalen Konzentration aus 5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Merck, 1.08382.2500), 5 mM Natriumchlorid (NaCl) (Sigma, S5880-1KG), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma, E1644-250G) und 12 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) (AppliChem, A4425,0500) zusammen. In diese Hybridisierungslösung wurden jeweils 10 nM zirkulare einzelsträngige Gerüststrang-DNA, 150 nM unmodifizierte Gegenstränge, sowie jeweils 300 nM Farbstoff- oder TCO-modifizierte und Biotin-modifizierte Gegenstränge gegeben. Für die die Herstellung von DNA-PAINT tauglichen DNA-Origami Strukturen wurden TCO-modifizierte Oligosequenzen benutzt. Nach erfolgter Faltung dieser TCO-modifizierten DNA-Origami Strukturen wurden diese mit einem 10-fach Überschuss an 5' - modifizierten Methyl-Tetrazin (M – Tet) Oligosequenzen (5' - 3': M-Tet- TTA TAC ATC TA) je TCO-Modifikation für 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend augereinigt.

### 3.3.4 Aufreinigung und Qualitätskontrolle

Nach erfolgter Hybridisierungsreaktion wurden als Referenzlösungen 10 µl der jeweiligen Hybridisierungslösungen entnommen und mit 2 µl Interkalationsfarbstoff (Safe-Green™, Applied Biological Materials Inc., G108-G) und 2 µl Ladepuffer, bestehend aus 10 mM TRIS (Merck, 1.08382.2500), 60 % Glycerol (v/v) (Merck, 1.37028.1000) und 0,03 % Bromphenolblau (w/v) (Carl Roth, T116.1), versetzt. Das restliche Volumen der jeweiligen DNA-Origami Konstrukte wurde jeweils mit 10 µl Ladepuffer versetzt. Für die Aufreinigung wurde ein 1,5 % (w/v) Agarosegel gegossen, das aus 0,75 g Agarose (Sigma, A9539-500G) bestand und mit 1x TBE, dessen 10x Pufferlösung aus 450 mM TRIS (Merck, 1.08382.2500), 450 mM Borsäure (Merck, K1898765) und 10 mM EDTA (Sigma, E1644-250G) bestand, auf 50 g aufgefüllt wurde. Nach Abkühlen des Agarosegels auf ca. 60 °C wurden dem Gel 12 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem, A4425,0500) zugefügt und das Agarosegel anschließend in einer Kammer gegossen und ausgekühlt. Das abgekühlte Agarosegel wurde in einer Agarosegelkammer (Mini-SubCell GT, BioRad) mit 0,5 x TBE-Puffer übergossen und die präparierten Lösungen in die jeweiligen Taschen überführt. Die Agarosegelkammer wurde an eine Spannungsquelle (PowerPac™ Basic, BioRad) angeschlossen und auf Eis eine Spannung von 70 V für ca. 2h angelegt. Nach 2 h wurden die Referenzbanden längst des Agarosegels abgeschnitten, unter einem UV Transilluminator (UST20M-8E, INTAS) die Bande mit einem Skalpell markiert und das UV Licht wieder abgeschaltet. Danach wurde das abgeschnittene Agarosegelstück, das die DNA-Origami Konstrukte ohne Interkalationsfarbstoff beinhaltetete, wieder mit dem Gel der markierten Referenzbande vereint und die jeweiligen DNA-Origami Konstrukte der jeweiligen Taschen auf Referenzbandenhöhe ausgeschnitten. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Banden mit einem Skalpell zerkleinert und in DNA-Gel-Extraktionszentrifugensäulen (Freeze N' Squeeze, 7326165, BioRad) überführt. Diese Zentrifugensäulen wurden für 5 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend mithilfe einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) für 3 Minuten bei 13.000 G abzentrifugiert. Die Säulen wurden daraufhin verworfen und der Inhalt der Röhrchen, der die aufgereinigten DNA-Origami beinhaltetete, für die weitere Verwendung genutzt.

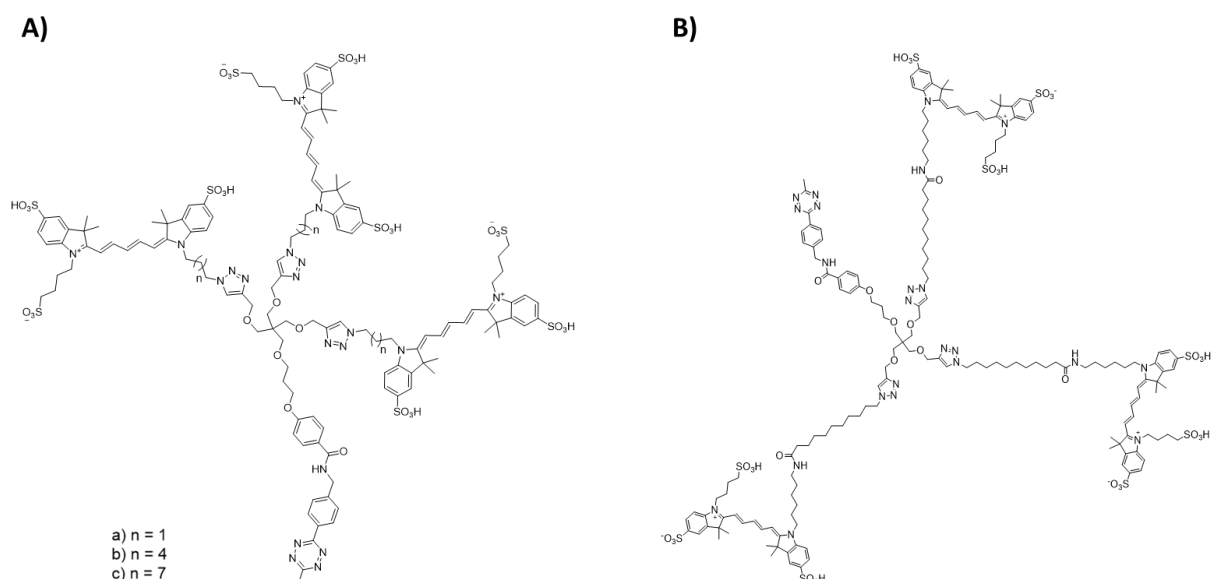
Für die Überprüfung der korrekten Struktur der DNA-Origami wurden die aufgereinigten Konstrukte unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (JEM 1011, JEOL) betrachtet. Die Aufnahmen wurden in der Zentralen Abteilung für Mikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg von Daniela Bunsen und Anne Krügl unter der Leitung



von Prof. Dr. Christian Stigloher durchgeführt. Hierzu wurden zuerst Kohlenstoff beschichtete 100 Mesh TEM-Grids frisch beglimmt. Auf die präparierten TEM-Grids wurden jeweils 15  $\mu\text{l}$  Probenlösung überführt und für 2 Minuten inkubiert. Die Probenflüssigkeit wurde anschließend mit einem Filterpapier abgezogen und das Grid 4-mal in 20  $\mu\text{l}$  einer 0,75 % Uranylacetatlösung (EMS, 22400) getaucht und direkt mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Grid für 45 Sekunden in 20  $\mu\text{l}$  einer 0,75 % Uranylacetatlösung inkubiert und anschließend mit einem Filterpapier die Flüssigkeit abgezogen. Die präparierten Grids wurden danach bis zum Einschleusen in das Transmissionselektronenmikroskop luftgetrocknet.

### 3.4 Dendronsysteme und -strukturen

Alle Dendronstrukturen wurden am Lehrstuhl für organische und biologische Chemie der organischen Chemie der Julius-Maximilians Universität Würzburg von Dr. Natalia Wolf und Louise Kersting unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Seibel synthetisiert. Die verwendeten Dendronsysteme und -strukturen sind in Abbildung 12 aufgeführt.



**Abbildung 12: Synthetisierte Dendronstrukturen unterschiedlicher Länge.** A) Diese Dendronstrukturen wurden von Dr. Natalia Wolf via Klick-Chemie synthetisiert. Dabei wurde eine Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Alkinen und Aziden durchgeführt, um die Alexa Fluor 647 modifizierten Dendronstrukturen aufzubauen. Dabei bezieht sich a), b) und c) auf die jeweiligen diversen Kohlenwasserstoffketten von  $n = 1$ ,  $n = 4$  und  $n = 7$ . Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese Dendronstrukturen als C3 ( $n=1$ ), C6 ( $n=4$ ) bzw C9 ( $n=7$ ), angelehnt an die Anzahl der Kohlenstoffe, bezeichnet. Als funktionelle Gruppe im aktiven Zentrum ist jeweils ein Tetrazine angebracht B) Diese Dendronstruktur wurde von Louise Kersting (Lehrstuhl für organische Chemie an der Julius-Maximilians Univesität Würzburg) ebenfalls über eine Huisgen-Cycloaddition durchgeführt. Diese Dendronstruktur ist ebenso mit Alexa Fluor 647 modifiziert und trägt ebenso ein Tetrazine im aktiven Zentrum. Auch hier wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit diese Struktur, angelehnt an die Länge der

Kohlenwasserstoffkette, als C17N (17 Kohlenstoffatome und einem Stickstoffatom) bezeichnet. Alle Dendronstrukturen spiegeln dabei die erste Generation (G1) dieser Dendronsysteme wieder.

Für die weitere Verwendung bzw. das Anbringen der Dendronsysteme an eine Zielstruktur, wurden alle Dendronen im aktiven Zentrum mit einem Tetrazin modifiziert, das über eine inverse Elektronenbedarfs-Diels-Alder-Reaktion unter physiologischen Bedingungen mit Trans-Cyclooctenen reagieren kann [36, 37, 38].

### **3.5 Probenpräparationen**

Im folgenden werden alle für diese Arbeit benötigten Fluorophore und biologischen Proben aufgelistet. Für alle Einzelmoleküloberflächen und Immunofluoreszenzproben wurden ein acht-Kammer hoch-präzisions Deckglassystem (Cellvis, C8-1.5H-N) mit einer Deckglasdicke von 170 µm präpariert und verwendet.

#### **3.5.1 Fluorophore**

Für diese Arbeit wurden die Farbstoffe Alexa Fluor 647 (Al647) (LifeTech, A20106), Cy5 (GE-Healthcare, PA15101), ATTO647N (ATTO-TEC, AD647N-31), CF660C (GE-Healthcare, SCJ4600050), ATTO565 (ATTO-TEC, AD565-31) und Cy7 (Biomol, 239054) als N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) verwendet. Des Weiteren wurde der Farbstoff Cy5 ebenfalls auch als H-Tetrazin (H-Tet) (Jena Bioscience, CLK-015-05) verwendet. Für DNA-PAINT Messungen der DNA-Origami Konstrukte wurde ein Cy3B gekoppelter Belichtungsstrang (5' - 3': Cy3B – CTA GAT GTA T, biomers.net GmbH) verwendet.

#### **3.5.2 Oligonukleotidmodifizierung**

Für Messungen der Cy7-DNA-PAINT Photokonversionsmethode wurden 5' Amin-modifizierter Oligos (5'-3': AmC6-GTAATGAAGA, biomers.net GmbH) mit Cy7-NHS Farbstoffen gekoppelt. Hierzu wurden 10 µM Oligonukleotide mit einem 25-fachen Überschuss an Cy7-NHS in 100 mM Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Fluka, 71999), pH ~ 9,5, zu einem Volumen von 100 µl für 4 h auf Raumtemperatur (RT, 20 °C) inkubiert. Die Kopplungslösung wurde anschließend mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgereinigt.

### 3.5.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für Analysen von freien Farbstoffen oder für die Kopplung von Farbstoffen an Oligonukleotidsequenzen wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) zur Aufreinigung durchgeführt. Hierzu wurde eine Kintex-Biphenylsäule (Phenomenex, 00F-4622-E0) mit einer Partikelgröße von 2,6  $\mu\text{m}$  und einer Porengröße von 100-Ångström ( $\text{Å}$ ) verwendet. Für die Aufreinigung von freien Farbstoffen bestand Eluent A aus 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure (Sigma, 302031) und Eluent B aus 75 % Acetonitril (ChemSolute, 2697.2500) mit 0,1 % Trifluoressigsäure (Sigma, 302031). Für die Aufreinigung von Oligonukleotid-gekoppelten Farbstoffen bestand Eluent A aus 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) (AppliChem, A3846,1000) und Eluent B aus 75 % Acetonitril (ChemSolute, 2697.2500) mit 0,1 M TEAA (AppliChem, A3846,1000). In beiden Fällen wurde ein linearer Gradient von 0 % Eluent B auf 60 % Eluent B über 30 Minuten, mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die jeweilige aufgefangene Probe wurde in einer Vakuumzentrifuge, bestehend aus einer Zentrifuge (ThermoSCIENTIFIC, SAVANT SPD111V), einer Kühlfalle (ThermoSCIENTIFIC, RVT400) und einer Ölpumpe (ThermoSavant, VLP80), getrocknet. Die so aufgereinigten und getrockneten freien Farbstoffen wurden in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) (Invitrogen, D12345) und die farbstoffgekoppelten Oligonukleotidsequenzen in vollentsalztem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) gelöst. Die jeweiligen Konzentrationen wurden anschließend durch Messungen der Absorption an einem UV-VIS Spektromerter (Jasco, V650) bestimmt.

### 3.5.4 Proteinmarkierung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden sekundäre Immunglobulin G Antikörper (IgG) gegen Kaninchentantikörper aus der Ziege (engl.: goat-anti-rabbit (gar)) (Invitrogen, 31212) und sekundäre IgG Antikörper gegen Mausantikörper aus der Ziege (engl.: goat-anti-mouse (gam)) (SigmaAldrich, SAB3701063-1) benutzt und mit Farbstoffen gekoppelt. Ebenso wurden auch primäre Kaninchen IgG Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Abcam, #ab18251) modifiziert. Für Analysen des Einflusses der Farbstoffdichte an Antikörper, wurden sekundäre Antikörper mit einem Überschuss an Al647-NHS und Cy5-NHS inkubiert. Die Kopplung der Antikörper mit Farbstoffen wurde für 4 Stunden auf Raumtemperatur (RT) in

100 mM Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Fluka, 71999) Kopplungspuffer bei einem pH-Wert von  $\sim 9,5$  durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  IgG Antikörper durch 0,5 ml Entsalzungssäulen (40K MWCO, ThermoFisher, 87766) in 100  $\mu\text{l}$  Kopplungspuffer überführt. Für die diversen Al647 Farbstoffkopplungsgrade wurden verschiedene Farbstoffüberschüsse verwendet. Für gam-IgG Antikörper mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 0,9$ , sowie für gar-IgG Antikörper mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 1,1$  wurde ein 2x Überschuss an Farbstoff, im Verhältnis zum IgG Antikörper, verwendet. Für den Kopplungsgrad von  $\sim 2,1$ ,  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  am gar – IgG Antikörper wurde jeweils ein 5x, 20x und 35x Farbstoffüberschuss verwendet. Für die Cy5 IgG-gar Kopplungsgrade von  $\sim 1,1$  bzw.  $\sim 3,7$  wurden 2x bzw. 15x Farbstoffüberschüsse eingesetzt. Für Analysen dieser gekoppelten Antikörper auf Einzelmoleküloberflächen, wurden zusätzlich primäre IgG Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Abcam, ab18251) mit Biotin-NHS (Merck, 203112) modifiziert. Hierfür wurden 100  $\mu\text{g}$  primäre Antikörper wie beschrieben in Kopplungspuffer überführt und mit 250  $\mu\text{g}$  Biotin-NHS (Merck, 203112) inkubiert. Zur Aufreinigung aller Antikörper wurden 0,5 ml Entsalzungssäulen (40K MWCO, ThermoFisher, 87766) verwendet und die Antikörper in Phosphatpuffer (PBS) (Sigma-Aldrich, D8537-500 ML) überführt. Für den Cy7-Kopplungsgrad von  $\sim 4,0$  an gar-IgG Antikörper wurde ein 35x Überschuss an Cy7-NHS verwendet und wie zuvor beschrieben vorgegangen. Für DNA – PAINT Ansätze wurden 100  $\mu\text{g}$  gar-IgG Antikörper mit einem 15x Überschuss an trans-Cycloocten-NHS mit einer 4-fach Polyethylenglycolkette (TCO-PEG4-NHS) (JenaBioscience, CLK-A137-10) verwendet und wie zuvor beschreiben vorgegangen. Die jeweilige Proteinkonzentration, sowie der jeweilige Farbstoffkopplungsgrad wurde durch Messung der Absorption an einem UV-VIS Spektromerter (Jasco, V650) bestimmt.

### 3.5.5 Zellpräparation und Zellfärbung

Für alle Ansätze wurden fibroblastenähnliche Zellen der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (COS7, Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, #605470) verwendet. Diese Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, #D8062), das 10 % fetales Kälberserum (SigmaAldrich, #F7524), 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, #P4333) beinhaltetete, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in T25 Kulturflaschen (Greiner Bio-One) herangezüchtet.

Für alle Immunofluoreszenzfärbungen wurden COS7 – Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/Kammer in die Kammern eines acht-Kammer hoch-präzisions Deckglassystem (Cellvis, C8-1.5H-N) überführt und für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Kammern wurden danach jeweils 3x mit 37 °C warmen Phosphatpuffer (PBS) (Sigma-Aldrich, D8537-500 ML) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 0,3 % Glutaraldehyd (GA) (EMS, 16220) und 0,25 % Triton X-100 (ThermoFisher, 28314) in einem speziellen Zytoskelletpuffer, bestehend aus 10 mM MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) ((Sigma-Aldrich, M8250), pH 6.1), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, 55886), 5 mM EGTA (Ethylendioxy-bis(ethylenitrilo)-tetraessigsäure) (Sigma-Aldrich, 03777), 5 mM Glukose (Sigma-Aldrich, G7021) und 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, M9272), für 2 Minuten permeabilisiert. Die Zellen wurden danach für 10 Minuten mit einer 37 °C warmen Lösung aus 2 % Glutaraldehyd (EMS, 16220) in Zytoskelletpuffer fixiert und anschließend 2x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen. Die Zellen wurden nach Fixierung mit 0,1 % Natriumborhydrid (Sigma-Aldrich, 71320) in PBS (Sigma, D8537-500ML) für 7 min inkubiert und anschließend 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 5 % (w/v) Rinderserumalbumin in PBS (Sigma, D8537-500ML) inkubiert und die Glasoberfläche für 30 min geblockt. Die behandelten Zellen wurden anschließend mit 2 ng/μl primären IgG Antikörper gegen α-Tubulin (Abcam, #ab18251), 2 ng/μl primären IgG Antikörper gegen β-Tubulin (Sigma-Aldrich, T8328) oder 2 ng/μl primären IgG Antikörper gegen Clathrin (Abcam, #ab21679) für eine Stunde in 5 % Rinderserumalbumin inkubiert. Nach der Inkubation mit primären Antikörpern wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit 0,1 % Tween20 (ThermoFisher, 28320) in PBS (Sigma, D8537-500ML) für jeweils 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 4 ng/μl sekundären IgG Antikörpern in 5 % Rinderserumalbumin für 45 Minuten behandelt. Nach der Inkubation mit sekundären Antikörpern wurden die Zellen einmal mit PBS (Sigma, D8537-500ML) und zweimal mit 0,1 % Tween20 (ThermoFisher, 28320) in PBS (Sigma, D8537-500ML) für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Antikörper wurden anschließend mit einer 4 % Formaldehydlösung (SigmaAldrich, F8775) in PBS (Sigma, D8537-500ML) für 10 Minuten fixiert und daraufhin 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen. Für die Immunofluoreszenzmarkierung mehrerer zellulärer Strukturen wurden ein sequentielle Inkubation durchgeführt und die jeweiligen Strukturen mit den jeweiligen primären und sekundären IgG Antikörpern nacheinander inkubiert und fixiert.

Für die Immunofärbung zellulärer Strukturen der DNA-PAINT Ansätze wurden die Zellen wie zuvor beschrieben behandelt und mit 5 ng/μl primären IgG Antikörpern gegen α-Tubulin (Abcam, #ab18251), sowie 10 ng/ μl sekundären IgG Antikörper (gar), modifiziert mit PEG4-TCO, inkubiert. Nachdem die Zellen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen wurden, wurde diese mit 10 μg/ml einer 5´-Tetrazin-modifizierten Oligonukleotidsequenzen (5´-3´: Tet- TTTCTTCATTA, biomers.net) für 15 Minuten in PBS (Sigma, D8537-500ML) auf Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen.

### **3.5.6 Einzelmoleküloberflächenpräparation**

Die verwendeten Deckglassysteme wurden zu Beginn einmalig mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und anschließend mit einer 2 % Hellmanexlösung (Hellma, 9-307-011-4- 507) für eine Stunde gereinigt. Darauf wurden die Kammern 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und für 20 Minuten mit 1 M Kaliumhydroxid (KOH) (Fulka, 06005) behandelt. Anschließend wurden die Deckgläserssysteme mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit 10 % Polyethylenglycol 400 (PEG<sub>400</sub>) (Fulka, 81170) inkubiert.

#### **Antikörperoberflächen**

Nach Behandlung mit 10 % PEG<sub>400</sub> wurden die Deckglassysteme 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einer Lösung aus 10 g/L Rinderserumalbumin (ThermoFisher, 30036578) und 0,01 g/L Biotin gekoppeltes Rinderserumsalbumin (ThermoFisher, 29130) in PBS (Sigma, D8537-500ML) inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und daraufhin mit 0,1 g/L Neutravidin (ThermoFisher, 31050) in PBS für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und mit 1 ng/μl biotinylierten primären IgG Antikörpern gegen α-Tubulin (Abcam, ab18251) für eine Minute inkubiert. Nachdem die inkubierten Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen wurden, wurden diese mit 0,5 ng/μl farbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper für 1 Minute in PBS (Sigma, D8537-500ML) inkubiert und die Oberfläche abschließend 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen.

### **Oligonukleotide Oberflächen**

Für die Herstellung von Einzelmoleküloberflächen aus doppelsträngigen Oligonukleotiden wurden 3' biotinylierte DNA-Sequenzen (5'-3': GGGGTATGTGTGTGGGG- [Btntg]) und 3' gekoppelte Sequenzen mit Alexa Fluor 647 (5'-3': CCCCACACACATACCCC[Al647]) verwendet. Alle Sequenzen wurden HPLC gereinigt bei IBA bestellt. Für die Hybridisierung der einzelsträngigen modifizierten Sequenzen wurden 1 µM biotinylierte Oligonukleotide und 0,1 µM Alexa Fluor 647 modifizierte Oligonukleotide in 50 µl PBS (Sigma, D8537-500ML) vereinigt. Die Hybridisierung der Sequenzen erfolgte durch einen Temperaturgradienten von 80 °C auf 4 °C mit -1 °C/min in 200 µl Reaktionsgefäßen (A. Hartenstein, RK02) zu je 50 µl Reaktionslösung. Der Hybridisierung wurde in einem ThermoCycler (C1000 Thermal Cycler, BioRad) durchgeführt.

Nach Behandlung der Oberflächen mit 10 % PEG<sub>400</sub> wurden die Deckglassysteme 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einer Lösung aus 10 g/L Rinderserumalbumin (ThermoFisher, 30036578) und 0,01 g/L Biotin gekoppeltes Rinderserumalbumin (ThermoFisher, 29130) in PBS (Sigma, D8537-500ML) inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und daraufhin mit 0,1 g/L Neutravidin (ThermoFisher, 31050) in PBS für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Oligonukleotidlösung 1:10000 in PBS (Sigma, D8537-500ML) verdünnt und die Oberfläche mit dieser verdünnten Lösung für eine Minute inkubiert. Abschließend wurde die Oberfläche 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen.

### **DNA-Origami Oberflächen**

Nach Behandlung mit 10 % PEG<sub>400</sub> wurden die Deckglassysteme 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einer Lösung aus 0,5 g/L biotinyliertem Rinderserumalbumin (ThermoFisher, 29130) in PBS (Sigma, D8537-500ML) inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen 3x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen und daraufhin mit 0,5 g/L Neutravidin (ThermoFisher, 31050) in PBS für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Oberflächen 1x mit PBS (Sigma, D8537-500ML) und 2x

mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem, A4425,0500) in PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen. Die DNA-Origami Konstrukte wurden jeweils am Tag der Messung hybridisiert und aufgereinigt. Hiermit wurde gewährleistet, dass die DNA-Origami Konstrukte intakt waren. Die aufgereinigten DNA-Origami Konstrukte wurden daraufhin jeweils 1:5 in 50 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem, A4425,0500) in PBS (Sigma, D8537-500ML) verdünnt und jeweils für 15 Minuten auf die präparierten Oberflächen gegeben. Abschließend wurde die Oberfläche 3x mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem, A4425,0500) in PBS (Sigma, D8537-500ML) gewaschen.



## 4 Ergebnisse

Alle folgenden Einzelmolekülmessungen, Ensemble Absorptions- und Emissionsmessungen, Fluoreszenzlebenszeit- und Photonenkoinzidenzmessungen, sowie alle bildgebende Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopiemessungen wurden von mir am Lehrstuhl der Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt. Sämtliche chemischen Analysen und Pufferbedingungen der Photokonversion von Cyaninfarbstoffen wurden von Dr. Siddharth S. Matikonda unter Leitung von Prof. Dr. Martin J. Schnermann am “Chemical Biology Laboratory” des “National Cancer Institute” in Frederick (USA), sowie von Prof. Dr. Alexander Greer am Lehrstuhl für Chemie des Brooklyn College der “City University of New York” in Brooklyn durchgeführt. Sämtliche Rekonstruktionen via neuronaler Netzwerke wurden von Prof. Dr. Philip Kollmansberger am “Center for Computational and Theoretical Biology (CCTB)” der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt. Alle DNA-PAINT Messungen wurden von Mara Meub am Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt. Des Weiteren wurden alle Messungen zur Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) in der Zentralen Abteilung für Mikroskopie am Biozentrum der Julius-Maximilians Universität Würzburg von Daniela Bunsen und Anne Krügl unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Stigloher durchgeführt. Sämtliche Fluoreszenzfärbungen und *d*STORM Messungen von Rezeptoren wurden vom Alexander Kuhlemann am Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt.

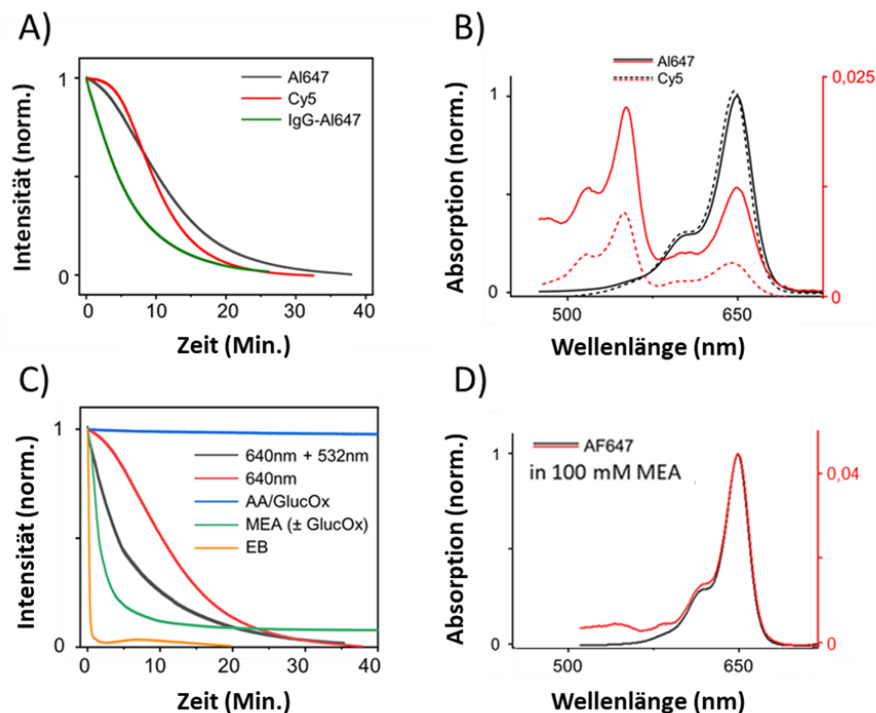
### 4.1 Photokonversion von Cyaninfarbstoffen

Im Folgenden werden alle Ergebnisse des Phänomens der Photokonversion von Cyaninfarbstoffen aufgeführt.

#### 4.1.1 Ensemble- und bildgebende Spektroskopie

Anfänglich wurden Küvettenmessungen zur Photostabilität von Cyaninfarbstoffen unter diversen Pufferbedingungen durchgeführt. Zu Beginn und am Ende dieser Messungen wurden Spektren der jeweiligen Absorption und Emission aufgenommen und verglichen. Die

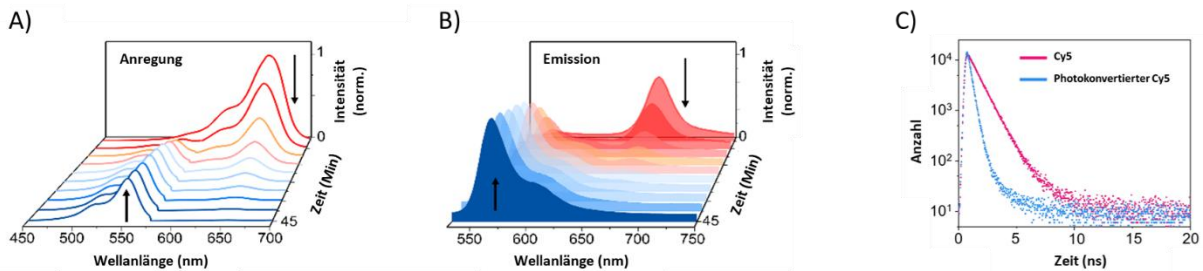
Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 13 aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass IgG gekoppelte Alexa Fluor 647 (Al 647) Farbstoffe einen steilen Abfall der Fluoreszenzintensität über die Zeit zeigen. Die beiden freien Farbstoffe Al 647 und Cy5 zeigen einen vergleichbaren Abfall der Fluoreszenzintensität über die Zeit, wobei Cy5 einen etwas schnelleren Abfall der Fluoreszenzintensität aufweist.



**Abbildung 13: Ensemble Photozerstörungsmessungen unter verschiedenen Pufferbedingungen.** A) Zeitspuren der Fluoreszenzintensitäten von freiem Alexa Fluor 647 (Al647) und Cy5 Farbstoff, sowie Al647 gekoppelten IgG Antikörpern in PBS (pH 7,4) unter  $0,7 \text{ W/cm}^2$  Laseranregung bei 640 nm. B) Relatives Ensemble Absorptionsspektren von Al647 (durchgezogene Linien) und Cy5 Farbstoff (gepunktete Linie) in PBS (pH 7,4) zu Beginn der Messungen (schwarz) und am Ende (rot) der Messungen von A). C) Zeitspuren der Fluoreszenzintensitäten von freiem Al647 Farbstoff unter  $0,7 \text{ W/cm}^2$  Anregung bei 641 nm in PBS (pH 7,4) (rot, 640 nm), unter zusätzlicher Anregung bei 532 nm (grau, 640 nm + 532 nm), unter Ascorbinsäure oder enzymatischen Sauerstoffentzugssystem, bestehend aus Glukose, Glukoseoxidase und Katalase, als Pufferzusätze (blau, AA/GlucOx), unter Zugabe von Thiolen mit/ohne Sauerstoffentzugssystem im Puffer (grün, MEA ( $\pm$ GlucOx)), sowie Zugabe von Erythrosin B (EB) unter zusätzlicher Anregung der Probe bei 532 nm (gelb). D) Relatives Absorptionsspektrum von Al647 unter Thiolpufferbedingungen (pH 7,4) ohne Verwendung eines Sauerstoffentzugssystems zu Beginn (schwarz) und am Ende (rot) der entsprechenden Messung von C) (grün). Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 2 (Publikationsliste): <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01061-2>.

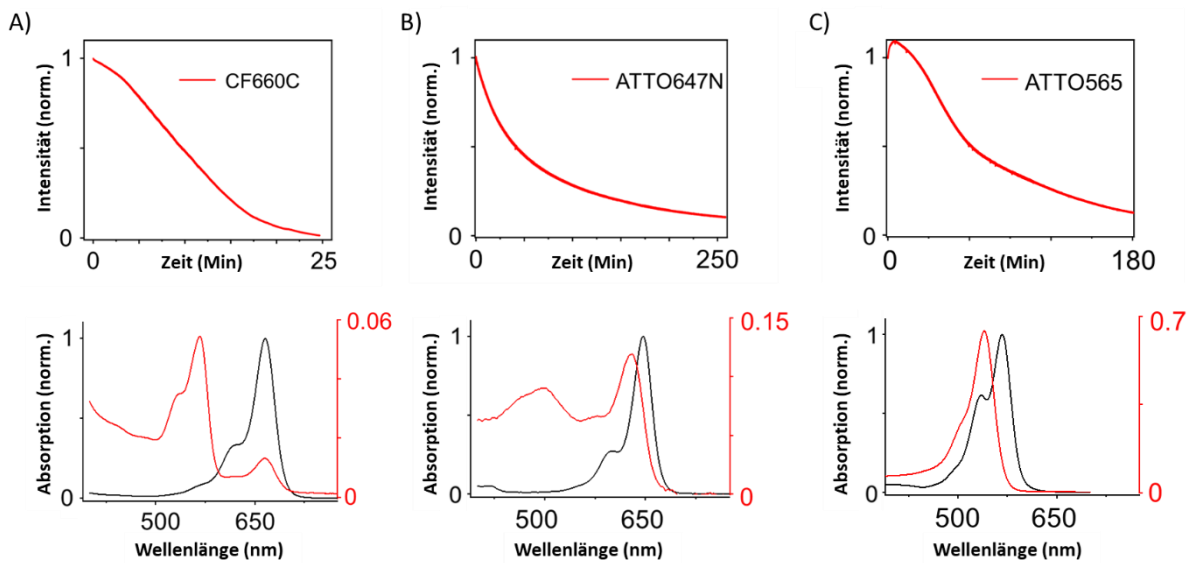
Zu Beginn der Messungen zeigen beide freie Farbstoffe (Al647 und Cy5) ein relativ ähnliches Absorptionsspektrum (Abb. 13 B). Nach den jeweiligen zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen zeigen beide Farbstoffe einen starken Abfall des initialen Absorptionsmaximums bei  $\sim 650 \text{ nm}$  und ein Auftreten eines neuen Absorptionsmaximums bei  $\sim 555 \text{ nm}$ . Der Farbstoff Al647 zeigt dabei nach Ende der zeitlichen

Fluoreszenzintensitätsmessungen ein etwas höheren Absorptionswert bei  $\sim 650$  nm und  $\sim 555$  nm als der Farbstoff Cy5. Bei zusätzlichen zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen unter diversen Pufferbedingungen (Abb. 13 C) zeigte sich, dass der Farbstoff Al647 mit zusätzlicher Anregung bei 532 nm einen steileren Abfall der Intensität aufweist und damit eine schnellere Photozerstörung verglichen mit fehlender zusätzlicher Anregung bei 532 nm. Des Weiteren zeigt sich keine Veränderung der Fluoreszenzintensität von Al647 bei Messungen in 100 mM Ascorbinsäure bzw. Sauerstoffentzugssystem im Puffer. Einen rapiden und sehr steilen Abfall zeigt hingegen die Fluoreszenzintensität von Al647 unter Zugabe von 10  $\mu$ M Erythrosin B (EB) und zusätzlicher Anregung bei 532 nm. Im Vergleich dazu zeigt die Fluoreszenzintensität in Thiopuffer (100 mM MEA, pH 7,4) einen etwas flacheren Abfall und ein rapides Stagnieren der Fluoreszenzintensität auf niedrigem Niveau. Die Messung der Absorption vor und am Ende der zeitlichen Verfolgung der Fluoreszenzintensität in Thiopuffer (Abb. 13 D) zeigt kein nennenswertes Absorptionsmaximum bei  $\sim 555$  nm. Die zeitliche Entwicklung dieses neu auftretenden Absorptionsmaximums bei  $\sim 555$  nm wurde durch Messungen der Anregungs- und Emissionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen einer 20  $\mu$ M Al647 Farbstofflösung in PBS (pH 7,4) genauer betrachtet. Dies ist in Abbildung 14 dargestellt. Es zeigt sich, dass das Absorptionsmaximum von Al647 bei  $\sim 650$  nm und dessen Emissionsmaximum bei  $\sim 680$  nm zu Beginn der Messung rapide abfällt, wohingegen sich das neu auftretende Absorptionsmaximum bei  $\sim 555$  nm, sowie das neu auftretende Emissionsmaximum bei  $\sim 565$  nm, erst langsam entwickelt und sich dann über die Zeit konstant verhält. Die Messungen der Fluoreszenzlebenszeit der Lösung des photokonvertierten Produktes, konnte mit der Fluoreszenzlebenszeit des Farbstoffes vor Beginn der Messung verglichen werden. Dazu wurde eine belichtete Cy5 Farbstofflösung am Ende der Messung mittels HPLC aufgereinigt, getrocknet, in ddH<sub>2</sub>O gelöst und dessen Fluoreszenzlebenszeit gemäß seines Emissionsmaximums bestimmt. Dabei zeigt sich, dass die Fluoreszenzlebenszeit von Cy5 zu Beginn der Messung bei  $\sim 0,9$  ns liegt, wohingegen das aufgereinigte photokonvertierte Produkt eine Fluoreszenzlebenszeit von  $\sim 0,31$  ns aufweist (Abb. 14 C). Das resultierende Photokonversionsprodukt von Al647 bzw. Cy5 weist eine starke Ähnlichkeit zu den spektroskopischen Eigenschaften eines Cy3 Farbstoffes auf (Abb. 14).



**Abbildung 14: Spektroskopische zeitliche Evolution der Photokonversion von Cyaninfarbstoffen und die resultierenden Fluoreszenzlebenszeiten.** A) Schematische Darstellung der Entwicklung des auftretenden Absorptionsmaximums bei  $\sim 555$  nm einer  $20 \mu\text{M}$  Al647 Farbstofflösung in PBS (pH 7,4), zu verschiedenen Zeitpunkten der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen unter  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  Anregungsleistung bei 641nm, durch Messung des Anregungsspektrums bei einer fest eingestellten Emissionswellenlänge von 600 nm bzw 720 nm. B) Resultierende zeitliche Emissionsspektren nach Anregung bei 530 nm bzw. 630 nm zu verschiedenen Zeitpunkten der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen einer  $20 \mu\text{M}$  Al647 Farbstofflösung in PBS (pH 7,4) unter  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  Anregungsleistung bei 641 nm. C) Fluoreszenzlebenszeitmessung in PBS (pH 7,4) einer Cy5 Farbstofflösung bei 670 nm zu Beginn der Messung der zeitlichen Fluoreszenzintensität (magenta), sowie die Fluoreszenzlebenszeit bei 565 nm der HPLC aufgereinigten photokonvertierten Farbstofflösung am Ende der Messung (blau). Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 2 (Publikationsliste): <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01061-2>.

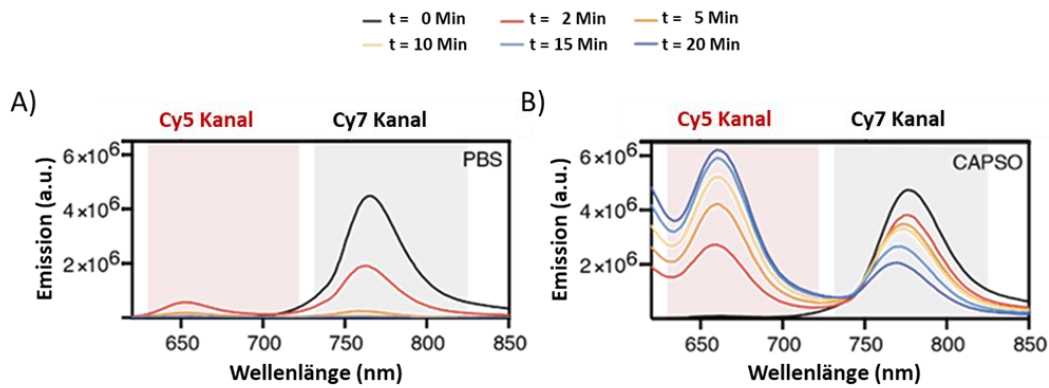
Darüber hinaus zeigte sich, dass dieses Phänomen der Photokonversion nicht nur bei Cyaninen auftritt, sondern auch bei anderen Farbstoffklassen zu beobachten ist, was teilweise literaturbekannt und beschrieben wurde [68]. Dies ist in Abbildung 15 dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass der cyaninbasierte Farbstoff CF660C einen raschen Abfall der Fluoreszenzintensität zeigt und am Ende der Messung das entsprechende Absorptionsspektrum dieser belichteten Farbstofflösung ein neues Absorptionsmaximum bei  $\sim 580$  nm auftritt, wohingegen das ursprüngliche Absorptionsmaximum bei  $\sim 666$  nm nahezu verschwunden ist. Der Rhodaminfarbstoff ATTO647N zeigt einen langsamen Abfall der Fluoreszenzintensität in PBS (pH 7,4) bei  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  Belichtungsleistung mit 640 nm. Dessen Absorptionsspektrum zeigt eine Verschiebung des Maximum auf  $\sim 640$  nm, sowie einen neu auftretenden Absorptionsschlag bei  $\sim 500$  nm am Ende der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessung nach ca. 250 Minuten. Dabei zeigte sich für diese beiden Proben nach den Messungen der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsverfolgung, dass die bestimmten Absorptionswerte minimal sind (Abb. 15 A und 15 B). Der Rhodaminfarbstoff ATTO565 zeigt ebenso ein langsames Abfallen der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungsleistung von  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  mit 532 nm, wohingegen sich hier das Absorptionsmaxima am Ende der Messung von ursprünglich  $\sim 564$  nm auf  $\sim 525$  nm deutlich verschiebt.



**Abbildung 15: Ensemble Küvettenmessung zur Photokonversion weiterer Farbstoffe.** A) Zeitliche Fluoreszenzintensität von CF660C in PBS (pH 7,4), sowie dessen relatives Absorptionsspektrum vor (schwarz) und nach (rot) Belichtung bei 641 nm mit einer Anregungsleistung von  $\sim 0,7 \text{ kW/cm}^2$ . B) Fluoreszenzintensitätstrajektorie und relatives Absorptionsspektrum von ATTO647N in PBS (pH 7,4) vor (schwarz) und nach (rot) Belichtung mit  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  bei 641 nm. C) Zeitliche Fluoreszenzintensitätsverfolgung und relatives Absorptionsspektrum von ATTO565 in PBS (pH 7,4) vor (schwarz) und nach (rot) Belichtung mit  $\sim 0,7 \text{ W/cm}^2$  bei 532 nm. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 2 (Publikationsliste): <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01061-2>.

Im nächsten Schritt wurde von Dr. Siddharth S. Matikonda unter Leitung von Prof. Dr. Martin J. Schnermann am "Chemical Biology Laboratory" des "National Cancer Institute" in Frederick (USA) getestet, unter welchen Pufferbedingungen die Verschiebung des Emissionsmaximums des Cyaninfarbstoffes Cy7 am effizientesten ist. Dies ist in Abbildung 16 zu sehen. Dabei zeigt sich abhängig von der Belichtungslänge der Cy7 Farbstoffe und der Pufferbedingung, dass die Farbstofflösung vermehrt bei  $\sim 665 \text{ nm}$  emittiert. Diese Verschiebung des Emissions von  $\sim 765 \text{ nm}$  (Cy7) auf  $\sim 665 \text{ nm}$  weist dabei Ähnlichkeiten zum Emissionsmaximum von Cy5 auf (Abb. 14 B und Abb. 16). Ein solches Verhalten zeigte sich zuvor ebenso bei der Photokonversion von Cy5-Farbstoffen, deren Konversionsprodukt eine starke Ähnlichkeit zu den spektroskopischen Eigenschaften eines Cy3 Farbstoffes aufweist (Abb. 14). Da das photokonvertierte Produkt der Cy7 Farbstoffe spektral ähnlich zu Cy5 ist, wurden Detektionsereignisse des Cy7 Photokonversionsproduktes hier mit Cy5 benannt. Bei den Analysen der Photokonversionsausbeute zeigte sich, dass die Effizienz der Photokonversion in PBS unter physiologischen Bedingungen nach Belichtung der Farbstoffprobe gering ist. Hierbei wurden nur Photokonversionseffizienzen von  $\sim 1 - 2 \%$  erreicht. Messungen in 0,5 M bzw. 1M CAPSO Puffer mit einem pH 9,5 – 10 zeigten hingegen eine weit höhere Effizienz der

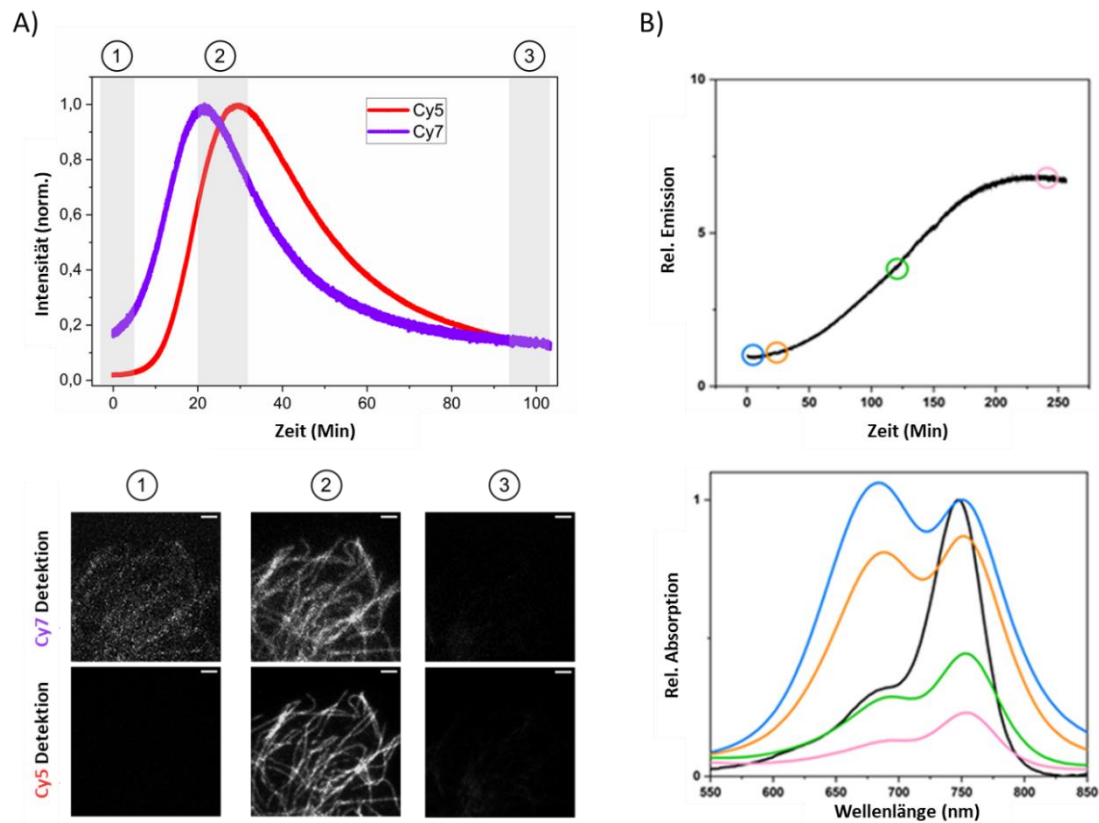
Photokonversion. Unter dieser Pufferbedingung konnte eine Effizienz der Photokonversion von Cy7 von  $\sim 15\%$  erreicht werden. Im Vergleich dazu, liefert der Zusatz von 10 mM Histidin in PBS eine leicht höhere Photokonversionseffizienzen unter physiologischen Bedingungen, wodurch Effizienzen von etwas über  $\sim 8\%$  erreicht werden können.



**Abbildung 16: Photokonversionseffizienzmessung von Cy7 unter verschiedenen Pufferbedingungen.** Messung der Fluoreszenzintensität einer 50  $\mu\text{M}$  Cy7 Farbstofflösung in A) 10 mM PBS (pH 7,4) und B) 0,5 M bzw. 1 M CAPSO (pH 9,5) zu verschiedenen Zeitpunkten der Belichtung der Probe mit  $\sim 0,2 \text{ W/cm}^2$  bei 630 nm. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Vor dem Hintergrund der höheren Photokonversionseffizienzen in 1 M CAPSO (pH 9,5) wurde darauf aufbauend versucht, dieses Phänomen in der Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen. Hierzu wurden IgG Antikörper mit Cy7 Farbstoff gekoppelt und Immunfluoreszenzfärbungen von Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen durchgeführt. Die so präparierten biologischen Proben wurden zuerst als Ensemblefluoreszenzsignal an einem Weitfeldmikroskop untersucht. Dabei ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal des Cy7-Detektionskanals langsam ansteigt und ebenso, zeitlich versetzt dazu, das Signal des Cy5-Detektionskanals. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wird zuerst im Cy7-Kanal registriert und einige Zeit später erreicht das Fluoreszenzsignal des Cy5-Kanals sein Maximum, wohingegen dort das Cy7-Fluoreszenzsignal bereits absinkt und schwächer wird. Beide Fluoreszenzsignale flachen daraufhin langsam wieder ab und erreichen zeitlich versetzt einen minimalen Wert nahe dem Hintergrundsignal. Dieser Verlauf ist in Abb. 17 A deutlich zu erkennen. Um nachzuvollziehen, warum das Fluoreszenzsignal der Antikörperproben dieses Verhalten zeigt, wurden Küvettenexperimente der Cy7 gekoppelten Antikörper in PBS (pH 7,4) unter  $\sim 0,1 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung bei 641 nm durchgeführt und die Fluoreszenzintensität

über die Zeit betrachtet. Das Absorptionsspektrum der belichteten Antikörperlösung wurde dabei zu verschiedenen Zeitpunkten der Messung aufgezeichnet (Abb. 17 B).



**Abbildung 17: Zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität und des Absorptionsspektrums von Cy7 gekoppelten Antikörpern.** A) Zeitliches Verhalten der Fluoreszenzintensität der via Immunofluoreszenz gefärbten Mikrotubulistrukturen, aufgespaltet in die separate Detektion des Cy7 Signals hinter einem Bandpassfilter ( $835 \pm 35$  nm) und des Cy5 Signals hinter einem Bandpassfilter ( $679 \pm 41$  nm). Die Messungen wurden in 1 M CAPSO (pH 9,5) unter Anregung mit  $\sim 0,1$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm im TIRF Beleuchtungsmodus durchgeführt. Markante Zeitpunkte der Messung wurden mit Nummern versehen, welche den unterhalb dargestellten Weitfeldfluoreszenzaufnahmen entsprechen. Maßstabsbalken 2  $\mu$ m. B) Ensemble Küvettenmessung des zeitlichen Fluoreszenzsignals einer 1  $\mu$ M-Lösung der in A) benutzten Cy7 gekoppelten Antikörper (DOL  $\sim 4$ ) in PBS (pH 7,4) unter  $\sim 0,1$  kW/cm<sup>2</sup> Belichtung bei 641 nm, detektiert hinter einem Bandpassfilter ( $835 \pm 35$  nm), sowie Messungen des Absorptionssignals zu verschiedenen Zeitpunkten (blau: 0 Min, orange:  $\sim 20$  Min, grün:  $\sim 2$  h und rosé:  $\sim 4$  h), im Vergleich zum Absorptionsspektrum des freien Cy7 Farbstoffes (schwarz) in PBS (pH 7,4). Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Über eine lange Zeit der Ensemble-Fluoreszenzsignalmessung steigt die Intensität an, bis sie nach ca. 4 h beginnt wieder leicht zu fallen (Abb. 17 B oben). Es ist erkennbar, dass das Absorptionsspektrum des Cy7 gekoppelten Antikörper zu Beginn der Messung eine stark ausgeprägte Dimerschulter bei  $\sim 675$  nm aufweist (Abb. 17 B unten, blau), wohingegen der freie Farbstoff lediglich ein Absorptionsmaximum bei  $\sim 753$  nm aufweist und keine ausgeprägte Dimerschulter bei  $\sim 675$  nm besitzt (Abb. 17 B unten, schwarz). Nach 20 minütiger

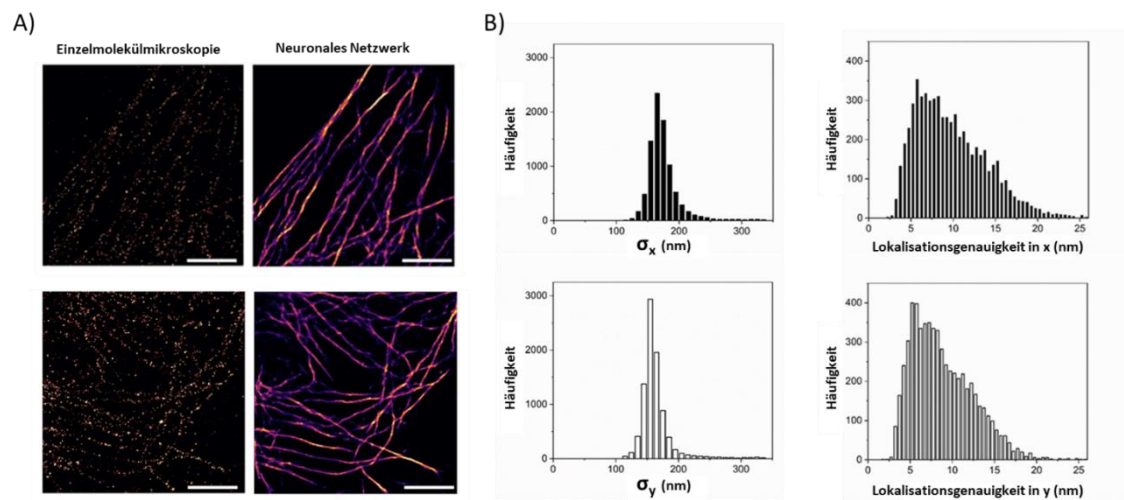
Belichtung mit  $\sim 0,1 \text{ kW/cm}^2$  bei 641 nm zeigt sich sowohl ein Rückgang der Absorption der Dimerschulter, als auch der Absorption bei  $\sim 753 \text{ nm}$ , wobei die Absorption bei  $\sim 675 \text{ nm}$  etwas stärker abnimmt. Nach  $\sim 2 \text{ h}$  Belichtung der Antikörperlösung mit  $\sim 0,1 \text{ kW/cm}^2$  bei 641 nm zeigt sich ein starker Rückgang der Absorption bei  $\sim 675 \text{ nm}$  und ein Rückgang der Absorption bei  $\sim 753 \text{ nm}$  auf ca. die Hälfte der Ausgangsabsorption (Abb. 17 B unten, grün). Nach ca. 4 h Belichtung der Antikörperprobe ist das Absorptionsmaximum bei  $\sim 753 \text{ nm}$  auf  $\sim \frac{1}{4}$  des Ausgangswertes abgesunken, wobei die am Anfang ausgeprägte Dimerschulter bei  $\sim 675 \text{ nm}$  vernachlässigbar ist (Abb. 17 B unten, rosé). Während die Absorption des Cy7 Signals nach  $\sim 4 \text{ h}$  auf  $\sim \frac{1}{4}$  abgesunken ist, erreicht dort die Fluoreszenzintensität ihren Höhepunkt (Abb. 17 B). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass das Absorptionsmaximum des Cy7 gekoppelten Antikörpers mit  $\sim 753 \text{ nm}$  im Vergleich zum Absorptionsspektrum des freien Cy7 Farbstoffes in PBS (pH 7,4), mit ein Maximum bei  $\sim 750 \text{ nm}$ , leicht bathochrom verschoben ist (Abb. 17 B).

#### 4.1.2 Photokonvertierung ermöglicht Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie

Zur Analyse, ob die Photokonversion von Cy7-Farbstoffen für die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie verwendet werden kann, wurden Immunofluoreszenzfärbungen von Mikrotubulstrukturen in COS7 Zellen mit Cy7-Farbstoff gekoppelten IgG Antikörpern (DOL  $\sim 4$ ) durchgeführt und Lokalisationsmessungen in 1 M CAPSO-Puffer (pH 9,5) an einem Weitfeldmikroskop durchgeführt. Dabei wurden die Proben lediglich mit 641 nm angeregt und die photokonvertierten Moleküle hinter einem Bandpassfilter ( $679 \text{ nm} \pm 21 \text{ nm}$ ) detektiert. In Abbildung 18 sind die resultierenden Aufnahmen und Ergebnisse der Rekonstruktion dargestellt. Dabei konnte bei  $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$  und bei  $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung Cy7-Farbstoffe photokonvertiert und die Fluoreszenz der photokonvertierten Moleküle detektiert werden, sowie aus den detektierten Emitttern entsprechende Mikrotubulstrukturen rekonstruiert werden (Abb. 18 A). Die Standardabweichung ( $\sigma_{x/y}$ ) der angenäherten Punktspreizfunktion der detektierten Emitttern betrug  $\sim 174,9 \text{ nm} \pm 26,9 \text{ nm}$  (Standardabweichung (SA)) in x- bzw.  $\sim 163,8 \text{ nm} \pm 27,2 \text{ nm}$  (SA) in y-Richtung (Abb. 18 B). Die photokonvertierten Emittter wiesen dabei eine Intensität von  $\sim 948,3 \pm 785,3$  (SA) Photonen pro Lokalisationsereignis auf und konnten dabei mit einer Genauigkeit von  $\sim 7,1 \text{ nm} \pm 3,0 \text{ nm}$  (SA) in x- bzw.  $\sim 6,6 \text{ nm} \pm 2,9 \text{ nm}$  (SA) in y-Richtung lokalisiert werden (Abb. 18 B). Dabei zeigt sich, dass aus den Lokalisationsdaten

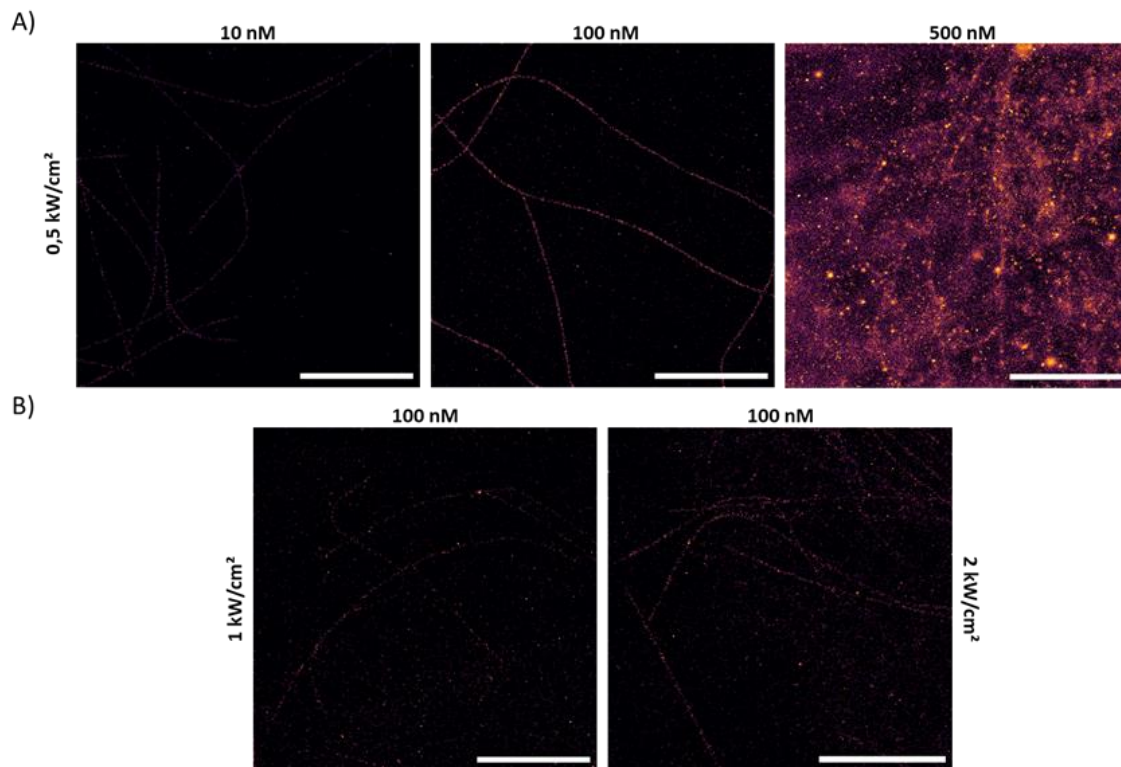


photokonvertierter Emitter keine durchgängige Mikrotubulstrukturen rekonstruiert werden können. Mithilfe eines trainierten künstlichen neuronalen Netzwerkes, können aus den Lokalisationsdaten durchgängige Mikrotubulstrukturen erzeugt werden (Abb. 18 A).



**Abbildung 18: Cy7 Photokonvertierungslokalisierung mittels Weitfeldmikroskopie.** A) IgG-Cy7 (DOL  $\sim 4$ ) immunomarkierte Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen belichtet mit  $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$  (oben) und  $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$  (unten) bei 641 nm in 1 M CAPSO (pH 9,5) und Detektion hinter einem Bandpassfilter ( $679 \pm 41 \text{ nm}$ ). Die Aufnahmen wurden mit einer Integrationszeit von 100 ms für  $\sim 83,3 \text{ min}$  durchgeführt. Links sind jeweils die Rohdaten der rekonstruierten Abbildungen gezeigt, während rechts die jeweiligen finalen Abbildungen nach Bearbeitung der rekonstruierten Rohdaten mit einem trainierten künstlichen neuronalen Netzwerkalgorithmus (ANNA-PALM) dargestellt sind. Skala:  $2 \mu\text{m}$ . B) Berechnete Standardabweichung ( $\sigma_{x/y}$ ) der angenäherten Punktspreizfunktionen, sowie die jeweilige Lokalisationsgenauigkeit in x- und y-Richtung der jeweiligen detektierten photokonvertierten Ereignisse. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

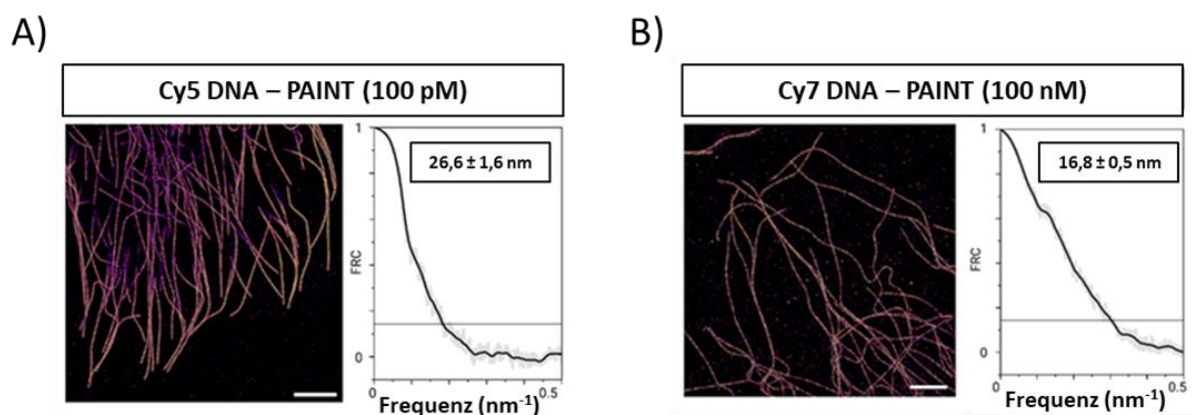
Im Vergleich dazu konnten durch Messungen mit der Lokalisationstechnik DNA-PAINT durchgängige Mikrotubulstrukturen rekonstruiert werden. Hierbei wurde eine Immunofärbung mit Oligonukleotid gekoppelten IgG Antikörpern durchgeführt. Für die Messungen wurden unterschiedliche Konzentrationen an komplementären Cy7 gekoppelten Oligonukleotidsequenzen in den Messpuffer gegeben. Die jeweiligen Messungen wurden im TIRF Belichtungsmodus bei 641 nm Anregung durchgeführt und die Fluoreszenz der jeweiligen photokonvertierten Moleküle hinter einem Bandpassfilter ( $679 \text{ nm} \pm 21 \text{ nm}$ ) detektiert. Zur Bestimmung, welche Konzentration an komplementären Cy7 gekoppelten Oligonukleotiden und welche Anregungsleistung ausreichend ist, wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt, sowie bei diversen Anregungsleistungen bei 641 nm gemessen. In Abbildung 19 ist dies graphisch dargestellt.



**Abbildung 19: Cy7-Photokonversion-Lokalisationsmikroskopie mittels DNA-PAINT.** A) Rekonstruierte Abbildungen der DNA-PAINT Messung von Oligonukleotid-gekoppelten IgG Antikörper markierten Mikrotubulistrukturen in COS7-Zellen bei 10 nM, 100 nM und 500 nM Cy7 gekoppelten komplementärer Oligonukleotiden in 10 mM Histidin + 500 mM NaCl (pH 7.4) bei 100 ms Integrationszeit nach  $\sim 1 - 1.5$  h mit einer Anregungsleistung von  $\sim 0,5$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm. B) Rekonstruktion der DNA-PAINT Messung von immunomarkierten Mikrotubulistrukturen in COS7-Zellen bei 100 nM Cy7 gekoppelten komplementärer Oligonukleotiden in 10 mM Histidin + 500 mM NaCl (pH 7.4) bei 100 ms Integrationszeit nach  $\sim 1 - 1.5$  h mit einer Anregungsleistung von  $\sim 1$  kW/cm<sup>2</sup> bzw.  $\sim 2$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm. Maßstabsbalken: 2  $\mu$ m.

Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 10 nM Cy7 gekoppelten Oligonukleotiden nahezu keine rekonstruierten Mikrotubulistrukturen nach  $\sim 1$ h Messzeit bei 100 ms Integrationszeit erzeugt (Abb. 19 A, Links). Eine Konzentration von 500 nM Cy7 gekoppelten Oligonukleotiden zeigte dabei einen deutlichen Hintergrund, sodass nach Rekonstruktion der Emitterlokalisationen keine eindeutige Zuordnung von Mikrotubulistrukturen möglich war (Abb. 19 A, Rechts). Eine Konzentration von 100 nM Cy7 gekoppelten Oligonukleotiden zeigte dabei ein gutes Verhältnis von Sichtbarkeit der rekonstruierten IgG gekoppelten Mikrotubulistrukturen und Hintergrundsignal durch unspezifische Cy7 gekoppelte Oligonukleotidenbindungen an die Glasoberfläche (Abb. 19 A, Mitte). Bei dieser Konzentration konnten Mikrotubulistrukturen gut sichtbar und durchgängig rekonstruiert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass eine Anregungsleistung von  $\sim 0,5$  kW/cm<sup>2</sup> für diese Lokalisationsmikroskopiemethode ausreichend ist und bei einer Anregungsleistung von  $\sim 1$

$\text{kW}/\text{cm}^2$  bzw.  $\sim 2\text{kW}/\text{cm}^2$ , bei gleicher Konzentration von Cy7 gekoppelten Oligonukleotiden, nahezu keine deutlichen und durchgängigen Mikrotubulstrukturen rekonstruiert werden konnten (Abb. 19 B). Im Vergleich zur herkömmlichen Cy5-DNA-PAINT Methoden, die bei  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen arbeiten, zeigte sich, dass DNA-PAINT mittels Photokonvertierung von Cy7-gekoppelten Oligonukleotiden bei deutlich höheren Konzentrationen arbeiten können. Des Weiteren konnte mittels Photokonversion-DNA-PAINT eine räumliche Auflösung von  $\sim 16,8 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$  (SA) erreicht werden, im Vergleich zu  $\sim 26,6 \text{ nm} \pm 1,6 \text{ nm}$  (SA) räumliche Auflösung bei Cy5-DNA-PAINT. Die jeweiligen rekonstruierten DNA-PAINT Aufnahmen sind in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Cy5 DNA-PAINT im Vergleich zu Cy7-Photokonversion-DNA-PAINT.** A) DNA-PAINT Messungen von immunomarkierten Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen mittels 100  $\mu\text{M}$  Cy5 gekoppelten komplementären Oligonukleotiden in PBS + 500 mM NaCl (pH 7,4) mit einer Anregungsleistung von  $\sim 0,5 \text{ kW}/\text{cm}^2$  bei 641 nm, sowie die mittels Fourier Ringkorrelation ermittelte räumliche Auflösung. B) Photokonversion DNA-PAINT Messungen von immunomarkierten Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen mittels 100 nM Cy7-gekoppelten komplementären Oligonukleotiden in 500 mM NaCl + 10 mM Histidin (pH 7,4) mit einer Anregungsleistung von  $\sim 0,5 \text{ kW}/\text{cm}^2$  bei 641 nm, sowie die mittels Fourier-Ringkorrelation ermittelte räumliche Auflösung. Maßstabsleiste: 5  $\mu\text{m}$ . Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Um beide Methoden genauer zu vergleichen und zu analysieren, wurden Messungen bei 10 ms, 20 ms und 50 ms Integrationszeit in 500 mM NaCl mit und ohne 10 mM Histidine (pH 7,4) durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen Bindezeiten der komplementären Cy7 gekoppelten Oligonukleotide, die Intensität der jeweiligen detektierten Fluoreszenz der Bindeereignisse, die jeweilige Anzahl der Bindeereignisse und die jeweilige Zeit zwischen den Bindeereignissen mittels zeitlicher Nachverfolgung lokalisierter Emitter (engl.: "tracking") genauer betrachtet. Dies ist in Tabelle 1 aufgeführt und in Abbildung 21 graphisch für 20 ms Integrationszeit dargestellt. Dabei zeigte sich, dass bei allen Aufnahmen, die Bindezeit der detektierten Emitter

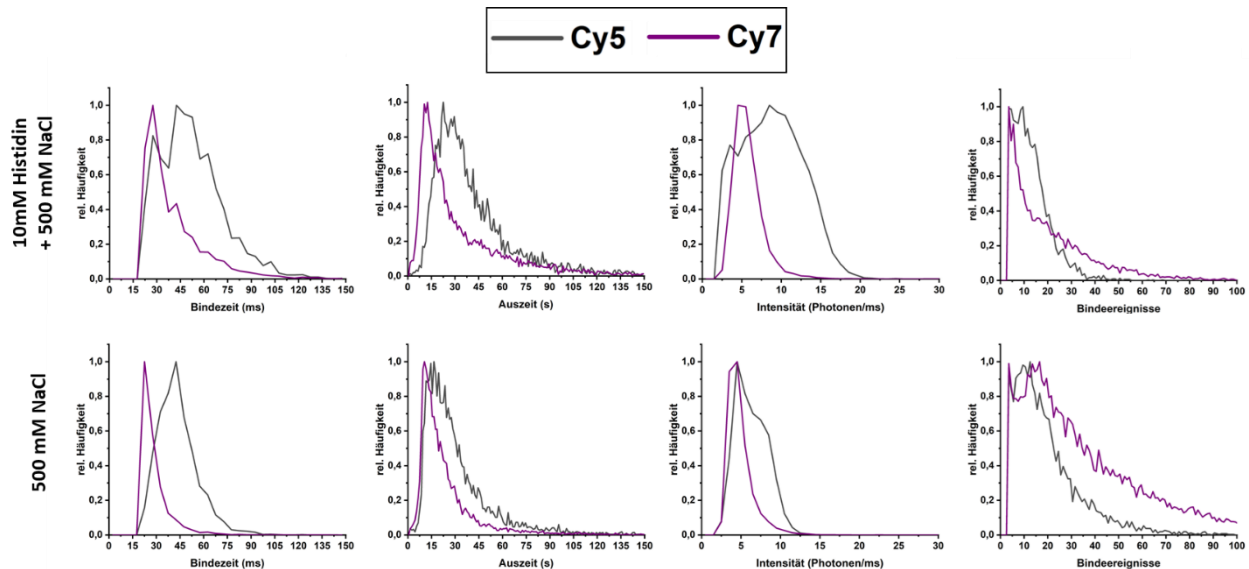
mit steigender Integrationszeit ansteigt. Des Weiteren zeigte sich, dass photokonvertierte Emitter unter den jeweiligen gleichen Pufferbedingungen stets eine niedrigere Zeit zwischen den Bindeereignissen aufweisen als beim konventionellen Cy5-DNA-PAINT Ansatz. Dabei wurden unter 500 mM NaCl (pH 7,4) jeweils die niedrigsten Auszeiten ermittelt. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz (Photonen / ms) nimmt dabei mit zunehmender Integrationszeit ab, wobei die detektierte Fluoreszenz der konvertierten Emitter stets niedriger war als bei der konventionellen Cy5-DNA-PAINT Methode. Die Anzahl der Bindeereignisse ist unter histidinhaltigen Pufferbedingungen (pH 7,4) für Cy5-DNA-PAINT und Photokonversion-DNA-PAINT vergleichbar. Unter histidinfreien Pufferbedingungen (pH 7,4) ist zu sehen, dass die Anzahl der Bindeereignisse der photokonvertierten Emitter höher ist, als bei den direkt gekoppelten Cy5-Oligonukleotiden, mit Ausnahme der Aufnahmen bei 10 ms Integrationszeit, bei denen sich die Häufigkeit der Bindeereignisse umgekehrt verhält.

**Tabelle 1: Analyse der Bindestatistik der DNA-PAINT Methoden.** Alle Messungen wurden mit einer Anregungsleistung von 0,5 kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm mit einer Aufnahmezeit von 8 Minuten. Die gemessenen Daten wurden mit einem Intensitätsfilter von ~ 40 Photonen und einer konvergierenden Ungenauigkeit, in der die Lokalisationen zur zeitlichen Nachverfolgung zusammengefasst sind (engl.: tracking), von 25 nm analysiert.

| 10 mM Histidin + 500 mM NaCl |                  |                |        |             |        |                    |        |                 |        |
|------------------------------|------------------|----------------|--------|-------------|--------|--------------------|--------|-----------------|--------|
| Strang                       | Integrationszeit | Bindezeit (ms) |        | Auszeit (s) |        | Intensität (ph/ms) |        | Bindeereignisse |        |
|                              |                  | Mittelwert     | Median | Mittelwert  | Median | Mittelwert         | Median | Mittelwert      | Median |
| Cy5<br>100 pM                | 10 ms            | 27,9 ± 12,7    | 26,2   | 34,8 ± 30,3 | 25,2   | 11,0 ± 3,9         | 10,7   | 16,4 ± 11,5     | 14     |
|                              | 20 ms            | 51,6 ± 20,8    | 48,9   | 41,6 ± 28,6 | 33,4   | 8,8 ± 3,8          | 8,7    | 12,5 ± 7,9      | 11     |
|                              | 50 ms            | 93,3 ± 26,8    | 89,6   | 44,6 ± 27,0 | 37,8   | 6,0 ± 3,3          | 6,0    | 11,0 ± 6,4      | 10     |
| Cy7<br>100 nM                | 10 ms            | 15,0 ± 5,5     | 13,6   | 33,6 ± 30,7 | 24,0   | 7,6 ± 1,9          | 7,2    | 15,9 ± 12,4     | 13     |
|                              | 20 ms            | 40,3 ± 20,2    | 33,6   | 32,6 ± 32,4 | 20,6   | 5,7 ± 1,9          | 5,3    | 21,0 ± 18,7     | 16     |
|                              | 50 ms            | 117,7 ± 72,7   | 100    | 40,5 ± 30,0 | 32,1   | 3,6 ± 1,2          | 3,5    | 12,7 ± 9,0      | 11     |
| 500 mM NaCl                  |                  |                |        |             |        |                    |        |                 |        |
| Cy5<br>100 pM                | 10 ms            | 20,9 ± 7,2     | 20     | 22,6 ± 20,8 | 16,6   | 8,5 ± 2,5          | 8,3    | 28,1 ± 21,1     | 22     |
|                              | 20 ms            | 43,0 ± 12,6    | 41,4   | 30,3 ± 24,5 | 23,7   | 6,2 ± 2,0          | 5,9    | 19,4 ± 15,3     | 15     |
|                              | 50 ms            | 86,7 ± 22,3    | 83,4   | 34,1 ± 24,7 | 27,3   | 4,3 ± 1,5          | 4,2    | 16,1 ± 10,7     | 14     |
| Cy7<br>100 nM                | 10 ms            | 13,9 ± 5,2     | 12,5   | 30,1 ± 25,6 | 23,2   | 7,5 ± 2,0          | 7,1    | 21,9 ± 19,7     | 16     |
|                              | 20 ms            | 29,8 ± 11,9    | 26,7   | 20,0 ± 21,5 | 13,7   | 4,7 ± 1,6          | 4,3    | 36,4 ± 29,9     | 28     |
|                              | 50 ms            | 78,2 ± 39,8    | 66,7   | 20,4 ± 20,4 | 14,6   | 2,6 ± 1,2          | 2,4    | 30,8 ± 20,9     | 27     |

Bei näherer Betrachtung der Messungen bei 20 ms Integrationszeit fällt auf, dass im Vergleich zu Cy5-DNA-PAINT, die Intensität, die Bindezeit, sowie die Zeit zwischen den Bindezeiten, bei Photokonversion-DNA-PAINT Messungen, sowohl mit, als auch ohne 10 mM Histidine, stets

niedriger sind (Abb. 21). Darüber hinaus ist hier bei histidinhaltigen Pufferbedingungen (pH 7,4) kein großer Unterschied in der Häufigkeit der Bindeereignisse zwischen Cy5-DNA-PAINT und Photokonversion-DNA-PAINT zu erkennen. Lediglich ohne Zusatz von Histidin ist zu erkennen, dass die Häufigkeit der Bindeereignisse von photokonvertierten Emitttern überwiegend höher ist als beim konventionellen Cy5-DNA-PAINT Ansatz.



**Abbildung 21: Statistik der Bindeereignisse der DNA-PAINT Methoden bei 20 ms Integrationszeit.** Histogramme der Verteilung der Bindezeit (Klasseneinteilung 5 ms), der Zeit zwischen den Bindeereignissen (Klasseneinteilung 1s), der Intensität der detektierten Signale (Klasseneinteilung 1 Photon/ms) und der Bindeereignisse (Klasseneinteilung 1) des konventionellen Cy5-DNA-PAINT und des Cy7 Photokonversion-DNA-PAINT Ansatzes. Die Messungen wurden mit einer Integrationszeit von 20 ms für jeweils ~ 8 Minuten in 500 mM NaCl mit und ohne 10 mM Histidin mit einer Anregungsleistung von ~ 0,5 kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm im TIRF Belichtungsmodus durchgeführt und anschließend die Lokalisationen mit rapidSTORM und der Ausgabeoption "track emission" mit einer konvergierenden Ungenauigkeit von 25 nm durchgeführt. Abbildung in Teilen entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

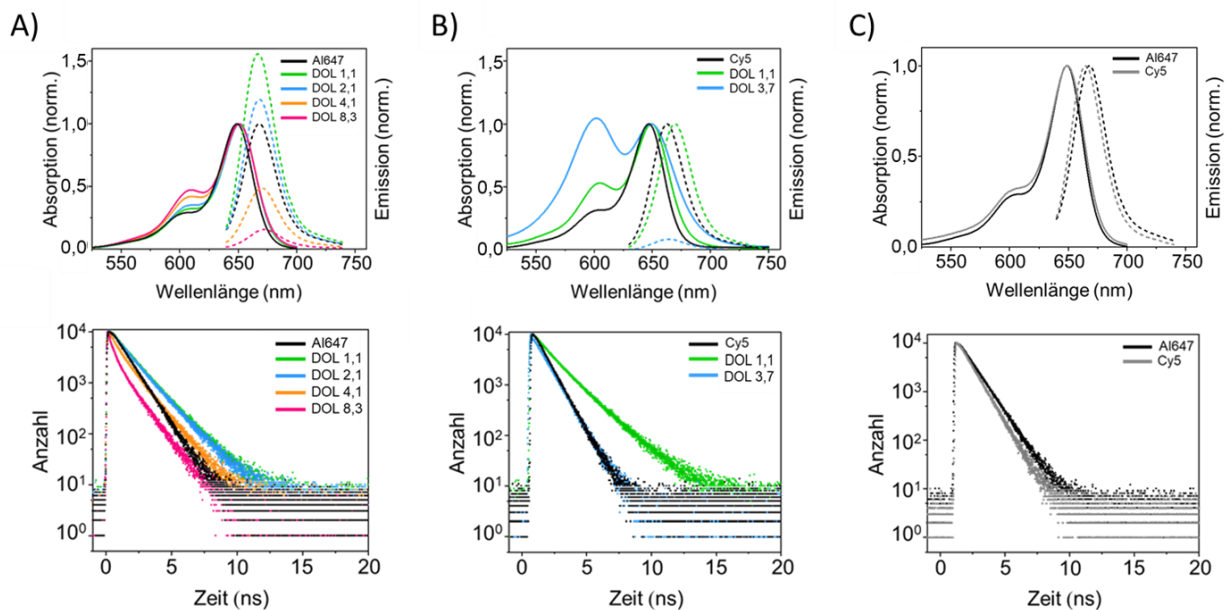
## 4.2 Einfluss des Farbstoffkopplungsgrades auf die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopiemethode *d*STORM

Für die Analysen des Farbstoffkopplungsgrades und dessen Auswirkungen auf die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopiemethode *d*STORM wurden sekundäre IgG Antikörper gegen primäre Antikörper (Wirt: Maus oder Kaninchen), mit den Farbstoffen Al647 und Cy5 gekoppelt. Die jeweiligen modifizierten Antikörper wurden daraufhin sowohl auf Ensembleebene, als auch auf Einzelmolekülebene analysiert.

#### 4.2.1 Ensemble- und bildgebende spektroskopische Analysen

Es konnten erfolgreich IgG Antikörper sowohl mit Al647, als auch mit Cy5 gekoppelt werden. Die diversen Kopplungsgrade (engl. Degree of Labeling (DOL)) entsprachen bei den Al647 markierten Antikörpern  $\sim 1,1$ ,  $\sim 2,1$ ,  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$ , sowie bei den Cy5 markierten Antikörpern  $\sim 1,1$  und  $\sim 3,7$ . Zu Beginn wurden diese markierten Antikörper im Hinblick auf ihre jeweilige Absorption, Emission und Fluoreszenzlebenszeit auf Ensemblesniveau spektroskopisch charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 22 dargestellt und in Tabelle 2 aufgelistet. Dabei zeigt sich, dass das Absorptionsspektrum der Al647 markierten Antikörper mit steigendem Kopplungsgrad eine zunehmende Schulter bei  $\sim 610$  nm aufweist, während die Emission dieser mit steigendem Kopplungsgrad stark abnimmt. Bei einem Kopplungsgrad von  $\sim 1,1$  ist das Maximum des Emissionsspektrums der Al647 gekoppelten Antikörper am höchsten, auch im Vergleich zur Referenz (freier Farbstoff). Auch beim Kopplungsgrad von  $\sim 2,1$  ist die Emissionsintensität leicht höher als bei der Referenz und fällt dann für die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  stark ab. Die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit (amplitudengewichtet) dieser Antikörper ist im Vergleich zur Referenz ( $\sim 1,09$  ns) für die Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  mit  $\sim 1,29$  ns bzw.  $\sim 1,28$  ns höher, wohingegen die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer der Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  auf  $\sim 0,74$  ns bzw.  $\sim 0,38$  ns stark verkürzt ist. Des Weiteren ist bei allen Al647 gekoppelten Antikörpern eine leichte bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums von  $\sim 649$  nm (freier Farbstoff) auf  $\sim 651$  nm (DOL  $\sim 1,1$ ,  $\sim 2,1$ ,  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$ ), sowie eine bathochrome Verschiebung des Emissionsspektrums der Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  von  $\sim 668$  nm (freier Farbstoff) auf  $\sim 676$  nm bzw.  $\sim 672$  nm zu erkennen. Das Emissionsspektrum des Kopplungsgrades  $\sim 2,1$  zeigt hingegen keine Verschiebung des Emissionsmaximums, während der Kopplungsgrad  $\sim 1,1$  nur eine minimale Verschiebung des Emissionsmaximums zu  $\sim 667$  nm aufweist. Die Cy5 gekoppelten Antikörper weisen eine starke Schulter im Absorptionsspektrum bei  $\sim 600$  nm auf, wobei die Schulter des Kopplungsgrades  $\sim 3,7$  die höchste Schulter in den Absorptionsspektren aufweist, die leicht höher ist als das Absorptionsmaximum von freiem Cy5 bei  $\sim 647$  nm. Die Absorptionsspektren der Cy5 gekoppelten Antikörper weisen dabei nur eine leichte bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $\sim 647$  nm (freier Farbstoff) zu  $\sim 649$  nm (DOL  $\sim 1,1$  und  $\sim 3,7$ ) auf. Das Emissionsmaximum der Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  und  $\sim 3,7$  sind ebenso, im Vergleich zur Referenz ( $\sim 663$  nm), bathochrom verschoben und weisen ein Maximum bei  $\sim 669$  nm bzw.  $\sim$

666 nm auf. Die Emissionsintensität des Kopplungsgrades  $\sim 1,1$  zeigt hingegen keine Veränderung im Vergleich zur Referenz, wohingegen der Kopplungsgrad  $\sim 3,7$  eine starke Reduktion der Emissionsintensität aufweist. Die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit des Kopplungsgrades  $\sim 1,1$  ist dabei mit  $\sim 1,38$  ns höher als die Fluoreszenzlebensdauer der Referenz ( $\sim 0,95$  ns), während die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit des Kopplungsgrades  $\sim 3,7$  mit  $\sim 0,88$  ns etwas niedriger ist.



**Abbildung 22: Ensemble spektroskopische Charakteristika mehrfach markierter Antikörper.** A) Normalisiertes Absorptions- und Emissionsspektrum (durchgehende Linien bzw. gepunktete Linien) mehrfach markierter Al647 IgG Antikörper zu einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  in PBS (pH 7,4), im Bezug zur Referenz des freien Al647 Farbstoffes, sowie die jeweilige amplitudengewichtete Fluoreszenzlebenszeit der jeweiligen mehrfach markierten IgG Antikörper. B) Normalisiertes Absorptions- und Emissionsspektrum (durchgehende Linien bzw. gepunktete Linien) mehrfach markierter Cy5 Antikörper bei einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  in PBS (pH 7,4), sowie die jeweilige durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit der Proben, in Bezug zum freien Cy5 Farbstoff. C) Vergleich der jeweiligen freien Farbstoffe zu einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  in PBS (pH 7,4) im Hinblick auf ihr jeweiliges Absorptions- und Emissionsspektrum (durchgehende Linien bzw. gepunktete Linien), sowie ihrer Fluoreszenzlebenszeit. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

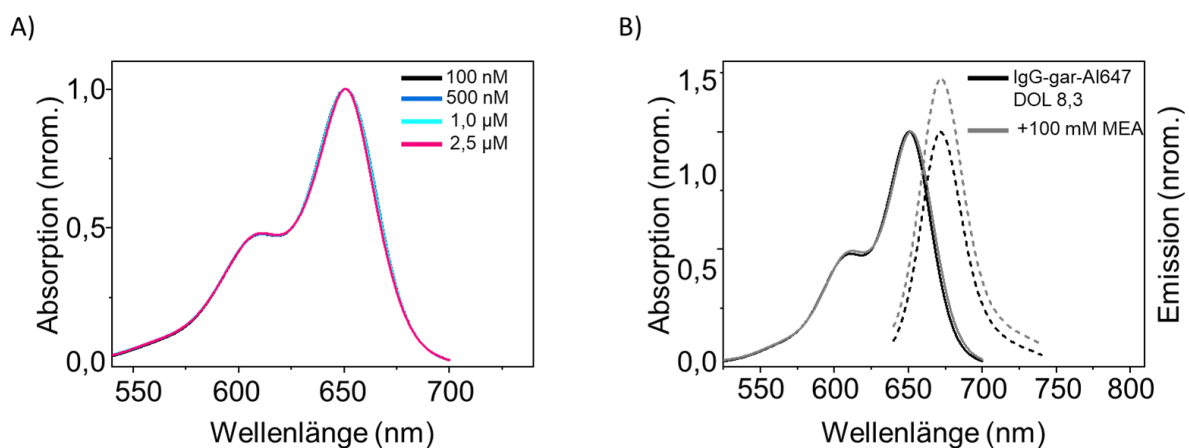
Die Referenzen von Al647 und Cy5 weisen dabei ähnliche spektroskopische Charakteristika auf, mit einem Absorptionsmaximum bei  $\sim 649$  nm bzw.  $\sim 647$  nm und einer durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeit von  $\sim 1,09$  ns bzw.  $\sim 0,95$  ns. Lediglich das Emissionsmaximum ist mit  $\sim 668$  nm bzw.  $\sim 663$  nm leicht verschoben, weist jedoch ein nahezu identisches Spektrum auf.

**Tabelle 2: Spektroskopische Charakterisierung mehrfach markierter IgG Antikörper.** Alle spektroskopischen Charakteristika (Absorptionsmaximum =  $\lambda_{\text{Abs., max}}$ , Emissionsmaximum =  $\lambda_{\text{Em., max}}$ , mittlere amplituden-gewichtete (A) Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_{\theta, \text{Amp.}}$ ) mehrfach Alexa Fluor 647 bzw. Cy5 markierter IgG Antikörper wurden in PBS

(pH 7,4) zu einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  gemessen. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ) wurden die Proben mit 640 nm angeregt und bei ihrem jeweiligen Emissionsmaximum detektiert. Die Abklingkurven der Fluoreszenzlebenszeit wurden mit dem Verfahren der kleinsten Quadrate der Entfaltung bestimmt und die Qualität der Annäherung an die Abklingfunktion über die jeweilige reduzierte Residuenquadratsumme ( $\chi^2 = 0,9 - 1,1$ ) beurteilt. Falls eine monoexponentielle Annäherung nicht ausreichend war, wurde eine multiexponentielle Annäherung durchgeführt ( $\tau_{\emptyset} = \tau_1 \cdot A_1 + \tau_2 \cdot A_2$ ). Die Kennzeichen  $A_n$  bzw.  $\tau_n$  beziehen sich auf die jeweiligen Parameter (Amplitude (A), Lebensdauer ( $\tau$ ) der entsprechenden Fluoreszenzlebenszeitkomponente der mono- (1, bzw.  $n = 1$ ) bzw. biexponentiellen (1 und 2, bzw.  $n = 1$  und  $n = 2$ ) Anpassung. Tabelle in Teilen entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

| Farbstoff | Kopplungsgrad | $\lambda_{\text{Abs., max}}$ (nm) | $\lambda_{\text{Em., max}}$ (nm) | $\tau_1$ (ns) / A1 | $\tau_2$ (ns) / A2 | $\tau_{\emptyset, \text{ Amp.}}$ (ns) |
|-----------|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Al647     | ---           | 649                               | 668                              | 1,09 / 1,0         |                    | 1,09                                  |
|           | 1,1           | 651                               | 667                              | 1,65 / 0,65        | 0,96 / 0,35        | 1,29                                  |
|           | 2,1           | 651                               | 668                              | 1,53 / 0,76        | 0,64 / 0,24        | 1,28                                  |
|           | 4,1           | 651                               | 670                              | 1,33 / 0,54        | 0,29 / 0,46        | 0,74                                  |
|           | 8,3           | 651                               | 672                              | 1,16 / 0,28        | 0,20 / 0,72        | 0,38                                  |
| Cy5       | ---           | 647                               | 663                              | 0,95 / 1,00        |                    | 0,95                                  |
|           | 1,1           | 649                               | 669                              | 1,82 / 0,61        | 0,69 / 0,39        | 1,38                                  |
|           | 3,7           | 649                               | 666                              | 0,99 / 0,83        | 0,36 / 0,17        | 0,88                                  |

Um analysieren zu können, ob die auftretenden spektroskopischen Effekte der mehrfach markierten Antikörper konzentrationsabhängig sind, wurde das Absorptionsspektrum der mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$  markierten Al647 IgG Antikörper bei diversen Konzentrationen in PBS (pH 7,4) gemessen. Dies ist in Abbildung 23 A aufgeführt. Des Weiteren wurden Vergleichsmessungen der spektroskopischen Eigenschaften mehrfach markierter Alexa Fluor647 Antikörper ( $\sim 8,3$ ) unter PBS-Bedingungen und thiolhaltigen Bedingungen durchgeführt (Abb. 23 B)

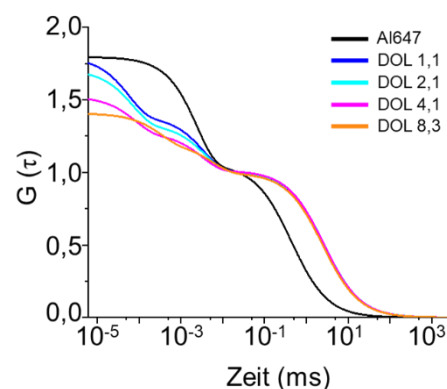


**Abbildung 23: Ensemble Konzentrationsabhängigkeitsanalyse und MEA Pufferanalyse des mehrfach markierten Al647 IgG Antikörpers mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$ .** A) Normalisiertes Absorptionsspektrum des mehrfach markierten Al647 IgG Antikörpers (DOL  $\sim 8,3$ ) in PBS (pH 7,4) zu einer Konzentration von  $\sim 100 \text{ nM}$  (schwarz),  $\sim 500 \text{ nM}$  (blau),  $\sim 1 \mu\text{M}$  (türkis) und  $\sim 2,5 \mu\text{M}$  (rosa). B) Normalisiertes Absorptions- und Emissionspektrum (durchgezogene Linien) mehrfach markierten Al647 IgG Antikörper (DOL  $\sim 8,3$ ) in PBS (schwarz) und 100 mM MEA (grau), pH 7,4, zu einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$ . Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste):



<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

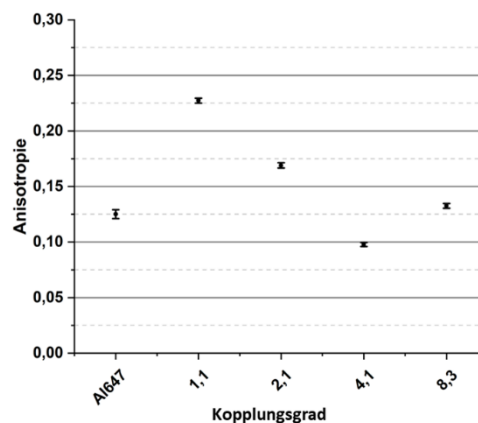
Dabei zeigt sich, dass die Absorptionsspektren bei unterschiedlichen Konzentrationen identisch sind (Abb. 23 A). Das Absorptionsmaximum verschiebt sich nicht und es zeigt sich auch kein weiterer Anstieg der Schulter bei  $\sim 610$  nm. Unter thiolhaltigen Pufferbedingungen steigt die Emissionsintensität, im Vergleich zu PBS – Messungen, an (Abb. 23 B). Zur genaueren Betrachtung der Effekte mehrfach markierter Antikörper wurden Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen (FCS) durchgeführt. Dabei wurden die mit Al647 mehrfach markierten Antikörper in Bezug auf den freien Alexa Fluor 647 Farbstoff bei einer Konzentration von  $\leq 1$  nM in PBS (pH 7,4) analysiert. Die jeweiligen Korrelationskurven sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiekurven mehrfach markierter Alexa Fluor 647 IgG Antikörper.** Kurven der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie mehrfach markierter Al647 Antikörper (DOL:  $\sim 1,1$  (blau),  $\sim 2,1$  (cyan),  $\sim 4,1$  (magenta),  $\sim 8,3$  (orange)) in PBS (pH 7,4) bei einer Konzentration von  $\leq 1$  nM und einer Anregungsleistung von  $\sim 40$   $\mu$ W bei 640 nm, in Bezug auf den freien Al647 Farbstoff (schwarz) als Referenz. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Hierbei ist zu erkennen, dass der freie Al647 Farbstoff, neben der Diffusionszeit, nur eine weitere Amplitude im unteren  $\mu$ s-Bereich besitzt. Die Diffusionszeit der mehrfach markierten Antikörper ist dabei untereinander identisch und liegt höher als die Diffusionszeit des freien Al647 Farbstoffes. Alle mehrfach markierte Antikörper zeigen, neben der Diffusionszeit im oberen  $\mu$ s-Bereich, zwei weitere Amplituden im ns- bzw. unteren  $\mu$ s-Bereich. Dabei sind diese Amplituden im  $\mu$ s- und ns-Bereich für den Markierungsgrad  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  am höchsten ausgeprägt und nehmen für den Kopplungsgrad von  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  etwas ab. Diese

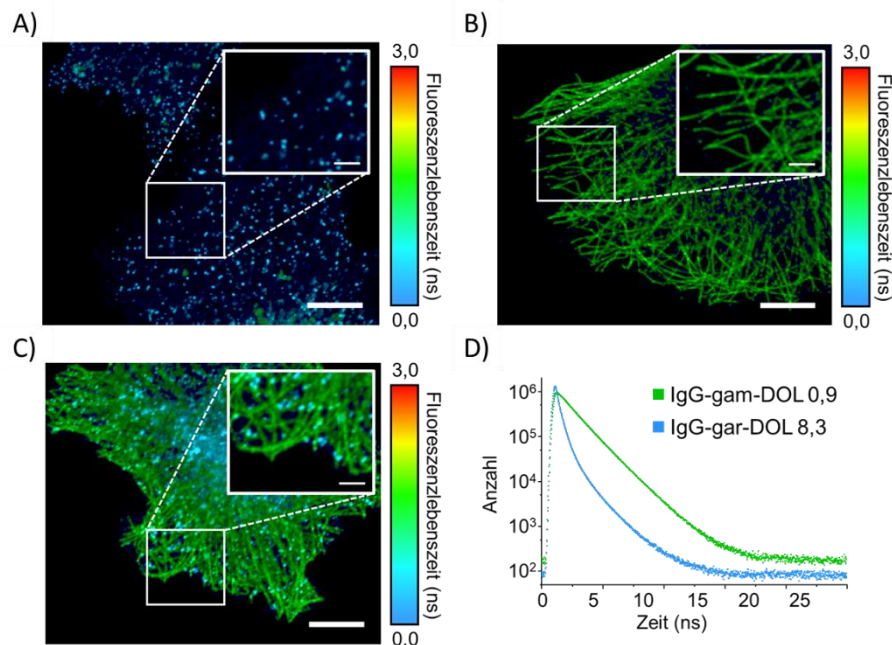
Amplituden liegen dabei stets unterhalb des Wertes der Amplitude des freien Farbstoffes. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Amplitude der mehrfach markierten Antikörper im unteren  $\mu\text{s}$ -Bereich nur minimal mit steigendem Kopplungsgrad abnimmt, wohingegen im Vergleich dazu, die Amplitude im ns-Bereich mit steigendem Kopplungsgrad stärker abnimmt. Darüber hinaus zeigten Messungen der Fluoreszenzanisotropie in PBS (pH 7,4) sinkende Polarisationswerte für höhere Kopplungsgrade. Die entsprechenden Messungen wurden dabei jeweils fünf mal durchgeführt. Dabei zeigte die Referenz des freien Farbstoffes einen durchschnittlichen Anisotropiewert von  $\sim 0,13 \pm 0,01$  (Standardabweichung (SA)). Die Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  zeigten dabei mit  $\sim 0,23 \pm 0,01$  (SA) bzw.  $\sim 0,17 \pm 0,01$  (SA) höhere Polarisationswerte als die des freien Farbstoffes, während die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  mit  $\sim 0,10 \pm 0,01$  (SA) bzw.  $\sim 0,13 \pm 0,01$  (SA) relativ ähnliche Werte zur Referenz aufzeigten. Eine Darstellung der Anisotropiewerte in Anhängigkeit des Kopplungsgrades ist in Abbildung 25 gezeigt.



**Abbildung 25: Fluoreszenzanisotropiewerte mehrfach markierter Al647 IgG Antikörper.** Die Messungen der Polarisationswerte mehrfach markierter Antikörper, sowie deren Referenz (freier Al647 Farbstoff), wurden in PBS (pH 7,4) bei einer Probenkonzentration von Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  durchgeführt. Die dargestellten Werte ergeben sich aus den Mittelwerten der jeweiligen Messreihe aus fünf Einzelmessungen.

Da, wie weiter oben gezeigt, die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe in PBS stark vom Kopplungsgrad abhängig ist, wurden Immunofluoreszenzfärbungen verschiedener zellulärer Strukturen in COS7-Zellen mit Al647 gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Da die Färbung dieser Strukturen antikörperbasierend ist, wurde ein weiterer sekundärer IgG Antikörper, gegen primäre Mausantikörper, mit Al647 gekoppelt und ein Kopplungsgrad von  $\sim 0,9$  erzielt. Als zweiter sekundärer Antikörper wurde der zuvor charakterisierte IgG Antikörper gegen primäre Kaninchenantikörper mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$  genutzt. Mit diesen

sekundären Antikörpern wurden Mikrotubulistrukturen via primäre Mausantikörper gegen  $\beta$ -Tubulin, sowie Clathrin-Vesikel, via primären Kaninchenantikörper gegen diese Vesikel, markiert. Die resultierenden Bilder der Fluoreszenzlebensdauerermessungen sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Fluoreszenzlebensdauerermessung mit mehrfach markierten Al647 Antikörpern.** A) Abbildung der Fluoreszenzlebensdauerermessung in PBS (pH 7,4) von immunmarkierten Clathrin-Vesikel über primäre Kaninchenantikörper gegen Clathrin-Vesikel und sekundäre IgG Antikörper gegen Kaninchenantikörper, mit einem Al647 Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$ . B) Fluoreszenzlebensdauerermessungsabbildung der Messung in PBS (pH 7,4) von immunmarkierten Mikrotubulistrukturen in COS7-Zellen über primäre Mausantikörper gegen  $\beta$ -Tubulin und sekundäre IgG Antikörper, mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 0,9$ , gegen Mausantikörper. C) Abbildung der Fluoreszenzlebensdauerermessung von immunmarkierten Mikrotubulistrukturen über primäre Mausantikörper gegen  $\beta$ -Tubulin und sekundäre IgG Antikörper, mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 0,9$ , gegen Mausantikörper, sowie Clathrin-Vesikel über primäre Kaninchenantikörper gegen Clathrin – Vesikel und sekundäre IgG Antikörper, mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$ , gegen Kaninchenantikörper, in COS7-Zellen in PBS (pH 7,4). D) Graphische Darstellung der jeweiligen Abklingkurve der Fluoreszenzlebensdauer der markierten Antikörper mit einem Kopplungsgrad von  $\sim 0,9$  (grün) und  $\sim 8,3$  (blau) gemessen in PBS (pH 7,4) bei 640 nm Anregung und jeweiliger Detektion der Photonen am Emissionsmaximum. Balkenskalen 10  $\mu\text{m}$ . Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

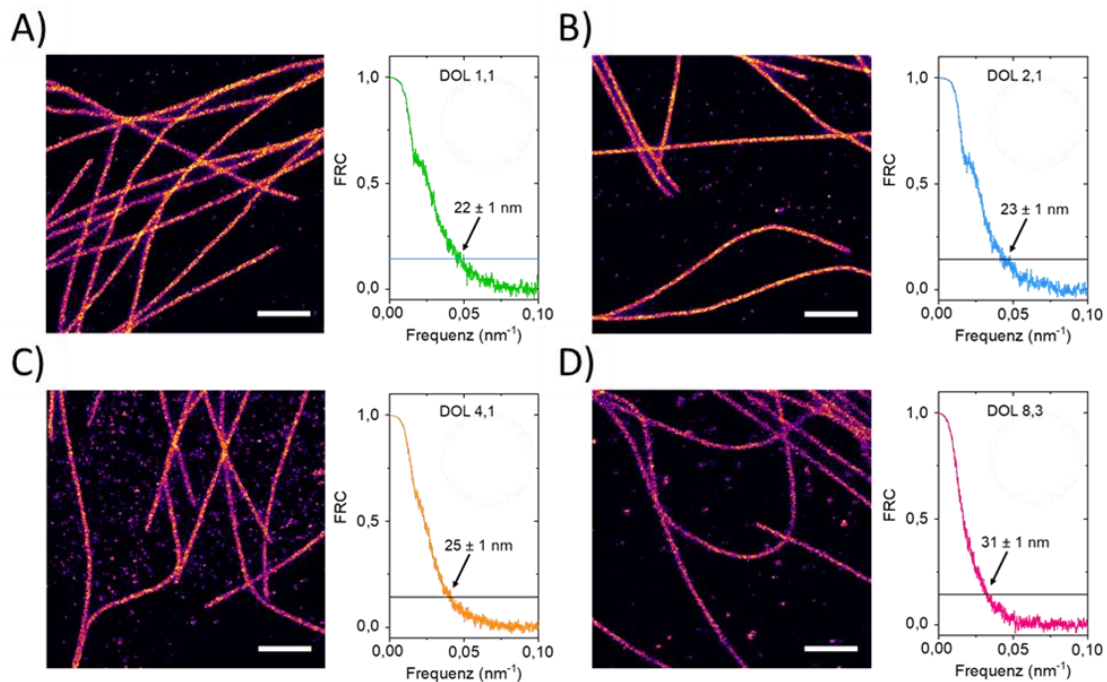
Dabei ist zu sehen, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer der beiden verwendeten Al647 markierten Antikörper mit unterschiedlichen Farbstoffkopplungsgraden deutlich unterscheidet. Der Markierungsgrad von  $\sim 0,9$  Farbstoffen weist dabei eine durchschnittliche amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer von  $\sim 1,49$  ns auf, wohingegen der Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$  eine amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer von  $\sim 0,38$  ns aufweist. Somit konnten die beiden zellulären Zielstrukturen in einer immunmarkierten

---

COS7-Zelle mithilfe der Fluoreszenzlebenszeit unterschieden und damit ein Mehrfarbenbild verschiedener zellulärer Strukturen mit dem selben Farbstoff zu unterschiedlichen Kopplungsgraden in PBS (pH 7,4) erzeugt werden.

#### 4.2.2 Einzelmoleküllokalisations- und einzelmolekülspektroskopische Analysen

Um diese Phänomene genauer zu analysieren wurden in weiteren Schritten spektroskopische- und lokalisationsbasierende Einzelmolekülaufnahmen durchgeführt. Hierfür wurden Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen mit Al647 gekoppelten IgG-Antikörpern durchgeführt, die einen Kopplungsgrad von  $\sim 1,1$ ,  $\sim 2,1$ ,  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  aufwiesen. Mit diesen, via Immunofluoreszenz gefärbten zellulären Strukturen, wurden Einzelmolekülaufnahmen, basierend auf der Mikroskopiemethode *d*STORM, durchgeführt. Die entsprechenden resultierenden hochaufgelösten zellulären Strukturen sind in Abbildung 27 dargestellt. Dabei wurden alle Aufnahmen mit einer Anregungsleistung von  $\sim 2 \text{ kW/cm}^2$  bei 641 nm durchgeführt. Des Weiteren wurden die Aufnahmen in Puffern bestehend aus 100 mM MEA mit und ohne Sauerstoffzugssystem in PBS (pH 7,4) sowohl mit zirkular, als auch mit linear polarisiertem Licht durchgeführt. Unter der Pufferbedingung mit einem Sauerstoffzugssystem und 100 mM MEA in PBS (pH 7,4) wurden darüber hinaus Aufnahmen mit zusätzlicher Anregung von  $\sim 8 \text{ W/cm}^2$  bei 405 nm durchgeführt. Alle Messungen wurden mit einer Integrationszeit von 8 ms (125 Hz) für 10 Minuten durchgeführt und anschließend die jeweilige Fluoreszenzzeit der detektierten Emitter ( $\tau_{AN}$ ), die Intensität der Fluoreszenz der Emitter ( $I_{AN}$ ), die Zeit zwischen den Detektionsereignissen der jeweiligen Emitter ( $\tau_{AUS}$ ), die Lokalisationsgenauigkeit der Emitter ( $\sigma_{Lok.}$ ), sowie die bildbasierende Auflösung, mittels Fourier-Ringkorrelation (engl.: Fourier ring correlation, FRC), bestimmt. Die jeweiligen Werte nach dieser Analyse sind in Tabelle 3 aufgeführt.



**Abbildung 27: Hochaufgelöste dSTORM Rekonstruktionen von immunmarkierten Mikrotubulstrukturen mit sekundären, mehrfach markierten Al647 Antikörpern.** Rekonstruktion der Einzelmoleküldaten der dSTORM Aufnahmen immunofluoreszenzmarkierter Mikrotubulstrukturen mit Al647 Kopplungsgraden der sekundären Antikörper von A)  $\sim 1,1$ , B)  $\sim 2,1$ , C)  $\sim 4,1$  bzw. D)  $\sim 8,3$ , gemessen in 100 mM MEA unter Verwendung eines Sauerstoffzugssystems mit  $\sim 2 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung bei 641 nm, sowie die jeweilige, mittels Fourier-Ringkorrelation, bestimmte bildbasierte räumliche Auflösung von A)  $\sim 22 \pm 1 \text{ nm}$ , B)  $\sim 23 \pm 1 \text{ nm}$ , C)  $\sim 25 \pm 1 \text{ nm}$  und D)  $\sim 31 \pm 1 \text{ nm}$ . Maßstabsleiste: 1  $\mu\text{m}$ . Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Dabei ist aus den jeweiligen Abbildungen zu erkennen, dass die Kopplungsgrade von  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  Al647 Farbstoffen pro sekundären IgG-Antikörper mit  $\sim 22 \pm 1 \text{ nm}$  bzw.  $\sim 23 \pm 1 \text{ nm}$  die höchste räumliche Auflösung erzielen. Im Vergleich dazu liefern die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  mit  $\sim 25 \pm 1 \text{ nm}$  bzw.  $\sim 31 \pm 1 \text{ nm}$  einen höheren Wert der FRC und damit geringere räumliche Auflösungen. Des Weiteren ist ersichtlich, dass Hintergrundsignale in den Aufnahmen A) und B) kaum zu erkennen sind, während dieses Signal bei den Aufnahmen C) und D) sehr stark ausgeprägt und deutlich sichtbar sind. Bei genauerer Analyse der Lokalisationsdaten ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensitäten der lokalisierten Emitter von  $\sim 307,4 \pm 81,0$  (SA) Photonen/ms (Kopplungsgrad  $\sim 4,1$ , 100 mM MEA mit enzymatischem Sauerstoffzugssystem und linear polarisierter Anregung) bis  $\sim 443,9 \pm 134,6$  (SA) Photonen/ms (Kopplungsgrad  $\sim 1,1$ , 100 mM MEA bei zirkular polarisierter Anregung) etwas schwanken aber sich nicht signifikant unterscheiden. Ebenso ist sowohl die jeweilige Fluoreszenzzeit, als auch die Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Emitter nahezu

identisch und schwankt nur leicht um den Wert von  $\sim 9$  ms bzw.  $\sim 6$  nm. Die Zeit zwischen den Lokalisationsereignissen ist dabei für linear und zirkular polarisierte Anregungen, unter den jeweiligen selben Pufferbedingungen, nahezu identisch. Die längsten Zeiten zwischen den Fluoreszenzereignissen der Emitter wurden in Messpuffern mit zusätzlichen enzymatischen Sauerstoffentzugssystem registriert. Diese Werte verringern sich mit zusätzlicher Anregung bei 405 nm wieder und erreichen hierbei Auszeiten, die nahe den Werten ohne Sauerstoffentzugssystem liegen. Ansonsten hat eine zusätzliche Anregung mit UV-Licht keinen nennenswerten Einfluss auf die übrigen bestimmten Werte. Die räumliche Auflösung der Aufnahmen schwankt zwischen  $\sim 17,2 \pm 0,5$  nm (Kopplungsgrad  $\sim 2,1$ , 100 mM MEA bei zirkular polarisierter Anregung) und  $\sim 30,7 \pm 1,1$  nm (Kopplungsgrad  $\sim 8,3$ , 100 mM MEA mit enzymatischen Sauerstoffentzugssystem und zirkular polarisierter Anregung). Dabei fällt auf, dass die bildbasierende Auflösung für die Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$ , bis auf einzelne Ausnahmen, niedrigere Werte aufwies als für die höheren Kopplungsgrade und damit eine höhere Auflösung erzielt wurde. Des Weiteren wurden mit dem Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$  die höchsten Werte erreicht und damit die schlechteste räumliche Auflösung erzielt (100 mM MEA mit enzymatischen Sauerstoffentzugssystem und zirkular polarisierter Anregung).

**Tabelle 3: Statistische Auswertung lokalisierter Emitter sekundärer mehrfach markierter Al647 Antikörper im Weitfeld.** Zeitliche Analyse immunfluoreszenzmarkierte Mikrotubulstrukturen in COS7-Zellen in Bezug auf die jeweilige Fluoreszenzintensität der detektierten Emitter ( $I_{AN}$ ) in Photonen/ms, der jeweiligen Detektionszeit des Signals ( $\tau_{AN}$ ) in ms, der Zeit zwischen den jeweiligen Lokalisationsereignissen der Emitter ( $\tau_{AUS}$ ) in Sekunden (s), der Lokalisationsgenauigkeit der Punktspreizfunktion der lokalisierten Signale ( $\sigma_{Lok.}$ ) in Nanometern ermittelt mit einem Beobachtungsradiusparameter von  $\sim 10$  nm und der jeweiligen bildbasierenden räumlichen Auflösung der jeweiligen Aufnahmen mittels Fourier-Ringkorrelation (FRC) in Nanometern. Die jeweiligen Messungen wurden bei einer Integrationszeit von 8 ms für jeweils 10 Minuten mit einer Anregungsleistung von  $\sim 2$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm mit und ohne zusätzliche Anregung mit  $\sim 8$  W/cm<sup>2</sup> bei 405 nm (UV) in 100 mM MEA-haltigen PBS Puffer (pH 7,4), sowohl mit, als auch ohne zusätzliches Sauerstoffentzugssystem mit linear und zirkular polarisiertem Anregungslicht durchgeführt. Die jeweiligen Werte der sekundären mehrfach markierten Al647 Antikörper-Aufnahmen wurden dabei jeweils histogrammiert und die durchschnittlichen Parameter mit ihrer Standardabweichung (SA) aufgelistet. Tabelle entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

| Polarisation und Bedingung | Kopplungsgrad | $I_{AN}$ (Photonen/ms <sup>-1</sup> ) | $\tau_{AN}$ (ms) | $\tau_{AUS}$ (s) | $\sigma_{Lok.}$ (nm) | FRC (nm)   |
|----------------------------|---------------|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------------|------------|
| Linear,<br>100 mM MEA      | 1,1           | 381,8 ± 123,2                         | 9,3 ± 1,1        | 18,4 ± 13,5      | 6,1 ± 3,2            | 22,2 ± 0,8 |
|                            | 2,1           | 415,8 ± 121,1                         | 9,1 ± 1,0        | 20,2 ± 13,2      | 5,5 ± 3,1            | 21,6 ± 0,5 |
|                            | 4,1           | 343,0 ± 109,2                         | 9,6 ± 1,5        | 19,3 ± 13,4      | 6,4 ± 3,1            | 20,8 ± 1,1 |
|                            | 8,3           | 359,3 ± 123,4                         | 9,8 ± 1,9        | 26,9 ± 17,7      | 5,8 ± 2,8            | 20,4 ± 0,5 |
|                            | 1,1           | 331,7 ± 67,4                          | 9,6 ± 1,1        | 20,6 ± 13,2      | 5,2 ± 2,3            | 19,1 ± 0,3 |

|  |     |               |           |             |           |            |
|--|-----|---------------|-----------|-------------|-----------|------------|
| Linear,<br>100 mM MEA +<br>Sauerstoffentzug                    | 2,1 | 382,5 ± 86,7  | 9,3 ± 1,0 | 20,6 ± 12,6 | 5,1 ± 2,4 | 20,5 ± 0,9 |
|  | 4,1 | 307,4 ± 81,0  | 9,4 ± 1,2 | 22,8 ± 14,6 | 5,7 ± 2,7 | 21,1 ± 0,4 |
|  | 8,3 | 408,8 ± 112,0 | 9,5 ± 1,3 | 29,4 ± 17,0 | 6,6 ± 3,9 | 20,6 ± 0,5 |
| Zirkular,<br>100 mM MEA  | 1,1 | 443,9 ± 134,6 | 9,0 ± 1,0 | 14,9 ± 11,5 | 5,3 ± 2,9 | 21,9 ± 0,7 |
|  | 2,1 | 412,3 ± 137,8 | 9,4 ± 1,8 | 16,1 ± 14,1 | 5,9 ± 3,1 | 17,2 ± 0,5 |
|  | 4,1 | 411,7 ± 115,2 | 9,4 ± 1,4 | 19,4 ± 13,6 | 5,8 ± 2,9 | 20,8 ± 0,8 |
| Zirkular,<br>100 mM MEA +<br>Sauerstoffentzug                  | 8,3 | 311,4 ± 101,0 | 9,5 ± 1,3 | 28,8 ± 17,0 | 6,6 ± 3,7 | 28,3 ± 0,9 |
|  | 1,1 | 421,0 ± 100,7 | 9,3 ± 0,9 | 20,4 ± 11,9 | 6,4 ± 3,9 | 21,8 ± 0,8 |
|  | 2,1 | 384,0 ± 88,0  | 9,5 ± 1,2 | 19,7 ± 12,8 | 5,4 ± 2,6 | 22,9 ± 1,0 |
| Zirkular,<br>100 mM MEA +<br>Sauerstoffentzug                  | 4,1 | 380,7 ± 119,0 | 9,6 ± 1,6 | 27,7 ± 18,4 | 5,9 ± 3,1 | 24,6 ± 0,7 |
|  | 8,3 | 381,9 ± 147,7 | 9,4 ± 1,5 | 30,4 ± 20,0 | 7,1 ± 4,2 | 30,7 ± 1,1 |
|  | 1,1 | 430,2 ± 125,7 | 9,3 ± 1,3 | 21,1 ± 15,5 | 6,3 ± 4,0 | 21,8 ± 0,8 |
| Zirkular,<br>100 mM MEA +<br>Sauerstoffentzug<br>+ UV-Anregung | 2,1 | 361,3 ± 95,8  | 9,4 ± 1,2 | 19,3 ± 13,1 | 6,6 ± 3,6 | 24,0 ± 1,7 |
|  | 4,1 | 388,6 ± 119,0 | 8,9 ± 1,0 | 20,5 ± 14,0 | 5,9 ± 3,4 | 24,0 ± 0,9 |
|  | 8,3 | 365,8 ± 101,7 | 9,1 ± 1,3 | 21,9 ± 15,7 | 6,2 ± 3,3 | 23,7 ± 1,0 |

Um auszuschließen, dass die in Tabelle 3 aufgelisteten Werte, aufgrund der mit sekundären Antikörpern dicht markierten Mikrotubulstruktur resultieren und damit durch überlappende Beobachtungsradien während der Analyse erzielt wurden, wurden mit den selben sekundären mehrfach markierten Al647 IgG-Antikörper Einzelmoleküloberflächen zu einer geringeren Dichte hergestellt. So sollte aufgrund der räumlichen Separierung der markierten Antikörper ausgeschlossen werden, dass die Beobachtungsradien während der Analyse der Lokalisationsdaten überlagern. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass die Werte der Fluoreszenzintensität relativ ähnlich zu den Werten der entsprechenden analysierten Lokalisationsdaten der Mikrotubulienaufnahmen in Tabelle 3 sind und auch hier keine signifikanten Unterschiede zeigen. Die Fluoreszenzzeit der Emitter ist mit ~10 ms etwas höher als bei den Mikrotubulidaten aber weisen auch hier keinen weiteren Unterschied zwischen den Pufferbedingungen auf. Die Lokalisationsgenauigkeit der Einzelmoleküloberflächen ist bei allen Pufferbedingungen mit ~ 5 nm relativ ähnlich und damit etwas geringer als die Werte in Tabelle 3. Die Werte der Zeiten des Dunkelzustands und damit die Zeiten zwischen den Lokalisationen der Emitter zeigen hier die identische Tendenz wie die Mikrotubulidaten aus Tabelle 3. Diese Werte sind für Pufferbedingungen mit Sauerstoffentzugssystem am größten und sinken mit zusätzlicher UV-Anregung auf vergleichbare Werte wie ohne Verwendung eines enzymatischen Sauerstoffentzugssystems

ab. Im Allgemeinen sind die analysierten Daten zur Einzelmoleküloberfläche der mehrfach markierten Antikörper vergleichbar zu den identisch analysierten Daten der immunomarkierten Mikrotubulstrukturen in COS7 – Zellen.

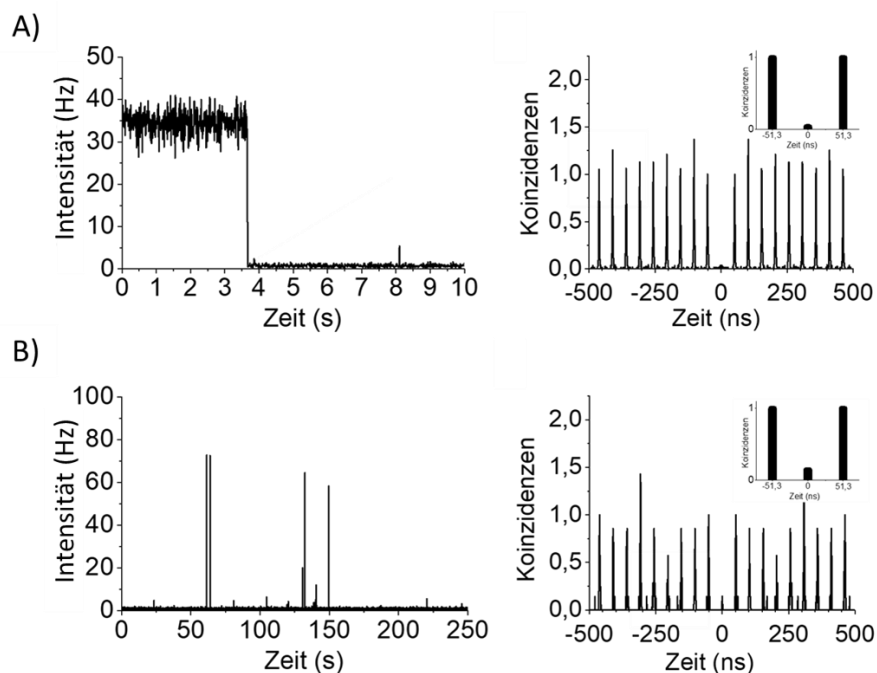
**Tabelle 4: Zeitliche Analyse der Einzelmoleküloberflächen mehrfach markierter Al647 Antikörper.** Die Auswertung erfolgte mit einem Beobachtungsradiusparameter von  $\sim 10$  nm. Ermittelt wurde die Fluoreszenzintensität der detektierten Emitter ( $I_{AN}$ ) in Photonen/ms, die Detektionszeit des Signals ( $\tau_{AN}$ ) in ms, die Zeit zwischen den Lokalisationsereignissen eines Emitters ( $\tau_{AUS}$ ) in Sekunden (s) und die Lokalisationsgenauigkeit der Punktspreizfunktion der Einzelmoleküle ( $\sigma_{Lok.}$ ) in Nanometern. Die Messungen wurden bei einer Integrationszeit von 8 ms für jeweils 10 Minuten mit einer Anregungsleistung von  $\sim 2$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm mit und ohne zusätzlicher Anregung mit  $\sim 8$  W/cm<sup>2</sup> bei 405 nm (UV) in 100 mM MEA-haltigen PBS Puffer (pH 7,4), sowohl mit als auch ohne zusätzliches Sauerstoffzugssystem mit zirkular polarisiertem Anregungslicht durchgeführt. Die analysierten Daten wurden histogrammiert und die durchschnittlichen Werte jeweils mit ihrer Standardabweichung (SA) aufgelistet. Tabelle entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

| Pufferbedingung                          | Kopplungsgrad | $I_{AN}$ (Photonen/ms <sup>-1</sup> ) | $\tau_{AN}$ (ms) | $\tau_{AUS}$ (s) | $\sigma_{Lok.}$ (nm) |
|--|---------------|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| 100 mM MEA                               | 1,1           | 396,8 ± 151,5                         | 10,2 ± 1,7       | 12,2 ± 11,8      | 5,1 ± 1,9            |
|  | 2,1           | 398,5 ± 156,7                         | 10,2 ± 2,1       | 10,1 ± 9,2       | 5,2 ± 1,9            |
|  | 4,1           | 396,0 ± 160,0                         | 10,2 ± 1,9       | 11,8 ± 11,2      | 5,2 ± 1,9            |
|  | 8,3           | 394,2 ± 159,6                         | 10,3 ± 2,1       | 11,2 ± 11,2      | 5,8 ± 2,1            |
| 100 mM MEA + Sauerstoffzug               | 1,1           | 356,3 ± 132,3                         | 11,0 ± 2,1       | 21,5 ± 18,7      | 5,1 ± 1,7            |
|  | 2,1           | 418,1 ± 161,6                         | 10,9 ± 2,2       | 22,4 ± 19,2      | 4,7 ± 1,6            |
|  | 4,1           | 398,2 ± 154,7                         | 10,9 ± 2,3       | 25,9 ± 23,8      | 4,8 ± 5,1            |
|  | 8,3           | 389,9 ± 154,5                         | 10,9 ± 2,5       | 24,4 ± 22,4      | 5,1 ± 1,9            |
| 100 mM MEA + Sauerstoffzug + UV-Anregung | 1,1           | 367,7 ± 181,5                         | 11,0 ± 2,8       | 12,2 ± 22,6      | 5,3 ± 1,8            |
|  | 2,1           | 369,0 ± 171,0                         | 10,8 ± 2,4       | 13,6 ± 25,3      | 5,3 ± 1,9            |
|  | 4,1           | 357,8 ± 177,0                         | 11,1 ± 3,3       | 10,8 ± 19,8      | 5,5 ± 1,9            |
|  | 8,3           | 367,8 ± 167,4                         | 11,1 ± 3,3       | 13,7 ± 24,9      | 5,3 ± 1,9            |

Da die analysierten Daten der diversen Kopplungsgrade starke Ähnlichkeiten aufwiesen und damit keine eindeutigen Unterschiede auf Einzelmolekülebene zu erkennen waren, wurden weitere spektroskopische Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Hierbei wurden die Einzelmoleküloberflächen der mehrfach markierten Antikörper an einem konfokalen Fluoreszenzlebenszeitmikroskop in einer Photonenkoinzidenzbestimmungskonfiguration gemessen um gemeinsame Photonendetektionsereignisse zu analysieren. Dabei wurden Messungen in PBS (pH 7,4) sowohl mit 100 mM MEA und enzymatischen Sauerstoffzugssystem, als auch mit  $\sim 1$  mM Trolox, durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden bei zirkularer Polarisation und einer Anregungsleistung von  $\sim 1$  kW/cm<sup>2</sup> bei 640 nm mit einer



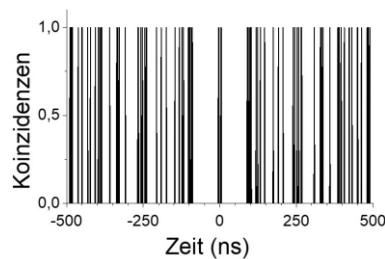
Laserpulsfrequenz von 19,5 MHz gemessen. Zur Überprüfung der Sensitivität dieser Anwendung und der Mikroskopkonfiguration wurden zuerst Intensitätsspannen einer Einzelmoleküloberfläche aus doppelsträngigen Oligonukleotidsequenzen, terminal gekoppelt mit einem einzelnen Al647 Fluorophor, vermessen. Die resultierenden Intensitätsspannen der verschiedenen Pufferbedingungen und ihr jeweiliges Photonenkoinzidenzhistogramm sind in Abbildung 28 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass das Fluoreszenzsignal unter den verwendeten Messbedingungen in troloxhaltigem Puffer nach wenigen Sekunden zum Erliegen kommt, während in thiolhaltigem Puffer das Fluoreszenzsignal im Laufe der Aufnahmezeit von 250 Sekunden mehrmals kurz detektiert wird und damit ein typisches Photoschaltverhalten aufweist. Das jeweilige Photonenkoinzidenzsignal zeigt dabei keinen zu berücksichtigenden Ausschlag zum Zeitpunkt  $t = 0$  und damit nahezu keine simultanen Photonendetektionsereignisse an den Detektoren. Die normalisierte Koinzidenz zum Zeitpunkt  $t = 0$  beträgt dabei  $\sim 0,030 \pm 0,004$  in troloxhaltigem Puffer und ist damit niedriger als in thiolhaltigem Puffer, bei dem die Koinzidenz der Photonendetektionsereignisse zum Zeitpunkt  $t = 0$  einen Wert von  $\sim 0,18 \pm 0,04$  aufweist.



**Abbildung 28: Intensitätsspannen und Photonenkoinzidenzsignal doppelsträngiger, terminal einfach markierter Al647 Oligonukleotidsequenzen.** A) Intensitätsspanne (Klasseneinteilung 10 ms) des Al647 Fluoreszenzsignals in PBS (pH 7,4) mit 1 mM Trolox (links), sowie das dazugehörige normalisierte Photonendiagramm der Koinzidenzverteilung (Klasseneinteilung 1 ns) (rechts) bzw. dessen vereinfachte Darstellung (Balkendiagramm) des Mittelwertes des Signals zum Zeitpunkt  $t = 0$ , ermittelt aus den jeweiligen 8 Nebenmaxima (4 zur jeder Seite). B) Messung der Fluoreszenzintensität über die Zeit (Klasseneinteilung 10 ms) in PBS (pH 7,4) mit 100 mM MEA und enzymatischem Sauerstoffzugssystem (links), sowie dessen normalisierte Koinzidenzverteilung der Photonen (Klasseneinteilung 1 ns) (rechts). Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1

(Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Zusätzlich dazu wurde die Koinzidenzverteilung der Hintergrundphotonen durch Analyse eines Bereiches der zeitlichen Fluoreszenzintensitätsmessungen, in dem kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde, bestimmt. Die resultierende Verteilung der Koinzidenzen der Hintergrundphotonen ist in Abbildung 29 dargestellt.

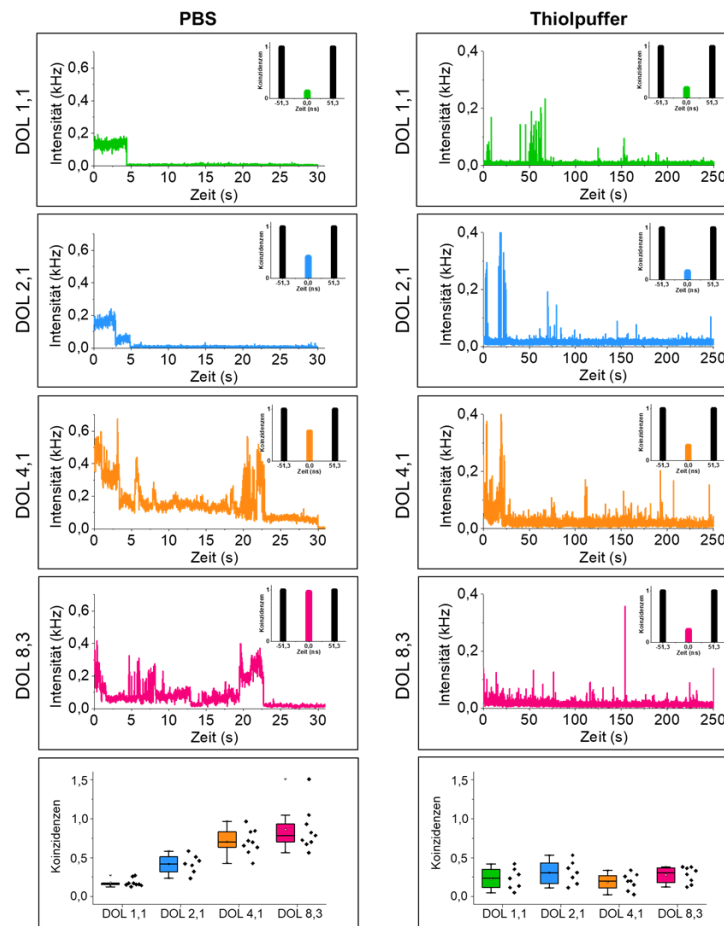


**Abbildung 29: Photonenkoinzidenzverteilung des Hintergrundsignals.** Normalisiertes Histogramm der Koinzidenzen (Klasseneinteilung 1 ns) der Hintergrundphotonen aus der Messung der zeitlichen Fluoreszenzintensität in PBS (pH 7,4) mit 100 mM MEA und enzymatischem Sauerstoffzugsystem (Abb. 28 B). Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Dabei zeigt sich, dass die Koinzidenzen der Hintergrundphotonen zufällig verteilt sind und ein hoher Wert simultaner Photonendetektionsereignisse zum Zeitpunkt  $t = 0$  auftritt. Durch die Ergebnisse in Abbildung 28 zeigt sich, dass die Systemkonfiguration und die Messbedingungen sensitiv und ausreichend sind, um Photonenkoinzidenzanalysen in PBS (pH 7,4) sowohl mit Troloxzugabe, als auch mit Thiolzugabe unter Sauerstoffzug durchführen zu können. Daher wurden im nächsten Schritt Photonenkoinzidenzmessungen der Einzelmoleküloberflächen der sekundären mehrfach gekoppelten Al647 Antikörper unter den beiden zuvor verwendeten Pufferbedingungen durchgeführt. Dabei wurden ca. 7 – 9 Messungen zu den oben beschriebenen Messeinstellungen für je 300 s durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 30 aufgeführt. Hierbei zeigt sich bei den Messungen unter troloxhaltigen Pufferbedingungen, dass die Kopplungsgrade von  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  jeweils klare Photozerstörungsstufen aufweisen, bei denen die Farbstoffe nach wenigen Sekunden der Belichtung zerstört werden. Die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  zeigen dahingehend sehr komplexe Fluoreszenzintensitätsverläufe mit stark fluktuierenden Intensitäten über eine vergleichsweise lange Zeit von  $\sim 25 - 30$  s, bevor auch diese Farbstoffe photozerstört wurden.

---

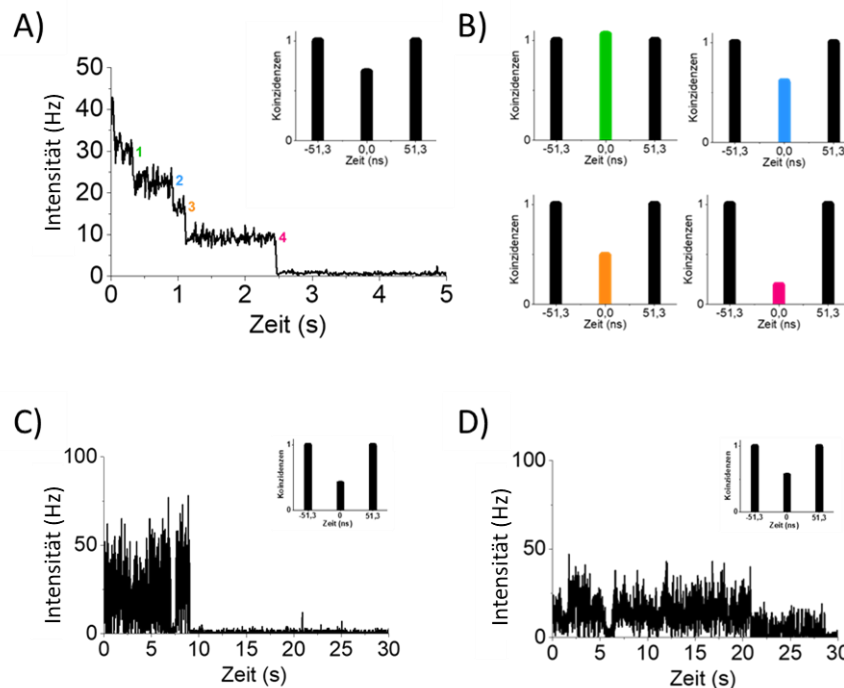
Die durchschnittlichen Photonenkoinzidenzen zum Zeitpunkt  $t = 0$  erreichten Werte von  $\sim 0,18 \pm 0,05$  (Kopplungsgrad  $\sim 1,1$ ),  $\sim 0,42 \pm 0,12$  (Kopplungsgrad  $\sim 2,1$ ),  $\sim 0,70 \pm 0,16$  (Kopplungsgrad  $\sim 4,1$ ) und  $\sim 0,86 \pm 0,28$  (Kopplungsgrad  $\sim 8,3$ ) und steigen damit mit steigendem Kopplungsgrad an. Die Messungen des zeitlichen Fluoreszenzverlaufes unter thiolhaltigen Pufferbedingungen mit Sauerstoffentzugssystem zeigen dabei für die Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  vereinzelt auftretende Fluoreszenzereignisse der Emitter über die gesamte Aufnahmezeit, wobei diese Ereignisse für den Kopplungsgrad von  $\sim 2,1$  etwas häufiger auftreten als beim niedrigsten Kopplungsgrad. Die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  zeigen dabei erneut ein sehr komplexes Fluoreszenzverhalten mit stark fluktuierenden Fluoreszenzintensitäten und sehr häufigen Fluoreszenzereignissen über die gesamte Aufnahmezeit von 300 Sekunden. Die jeweiligen durchschnittlichen Photonenkoinzidenzen zum Zeitpunkt  $t = 0$  zeigten dabei mit  $\sim 0,23 \pm 0,13$  (Kopplungsgrad  $\sim 1,1$ ),  $\sim 0,31 \pm 0,15$  (Kopplungsgrad  $\sim 2,1$ ),  $\sim 0,19 \pm 0,10$  (Kopplungsgrad  $\sim 4,1$ ) und  $\sim 0,27 \pm 0,11$  (Kopplungsgrad  $\sim 8,3$ ) sehr ähnliche und durchgehend niedrige Werte. Vor allem die hohen Kopplungsgrade von  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  zeigen im Vergleich zu den Aufnahmen in troloxhaltigem Puffer eine deutliche Veränderung der durchschnittlichen Photonenkoinzidenzwerte zum Zeitpunkt  $t = 0$  und damit nahezu identische Werte zu den niedrigen Kopplungsgraden. Diese zeigen wiederum vergleichbare Werte wie in troloxhaltigen Pufferbedingungen.



**Abbildung 30: Zeitspuren der Fluoreszenzintensität und Photonenkoinzidenzwerte mehrfach markierter Antikörper.** Fluoreszenzintensitätsspuren (Klasseneinteilung 10ms) der Kopplungsgrade  $\sim 1,1$  (grün),  $\sim 2,1$  (blau),  $\sim 4,1$  (orange) und  $\sim 8,3$  (magenta) in PBS (pH 7,4) mit Zugabe von Trolox (links) und Thiolen (rechts), sowie in den unteren Balken- und Streudiagrammen, die jeweils farblich übereinstimmende durchschnittliche Koinzidenzrate zum Zeitpunkt  $t = 0$  der jeweiligen 7 – 9 Einzelmessungen. Die Messungen wurden mit zirkular polarisiertem Licht bei 640 nm mit einer Anregungsleistung von  $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$  belichtet. Die Einschübe in den Fluoreszenzintensitätsspuren zeigen die vereinfachte Darstellung des Koinzidenzwertes zum Zeitpunkt  $t = 0$  über die gesamte Aufnahmezeit. Dieses Balkendiagramm wurde aus dem zentralen Maximum und dem Mittelwert der jeweils vier benachbarten Maxima berechnet. Intensitäten sind in Hz angegeben. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Das Balken- und Streudiagramm zu den Messungen unter troloxhaltigen Pufferbedingungen in Abbildung 30 zeigt für die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  eine breite Streuung der durchschnittlichen Photonenkoinzidenzwerte zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Dabei zeigen diese beiden Kopplungsgrade in einzelnen Fällen sowohl durchschnittliche Photonenkoinzidenzwerte nahe 0,5, als auch nahe 1. In Abbildung 31 sind einzelne Zeitspuren und deren Photonenkoinzidenzdiagramme dieser extremen Beispiele gezeigt. Dabei zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensitätsspuren des Kopplungsgrades  $\sim 4,1$  in Ausnahmefällen auch Photozerstörungsstufen aufzeigen kann, wobei hier  $\sim 4$  Stufen klar zu erkennen sind, bevor

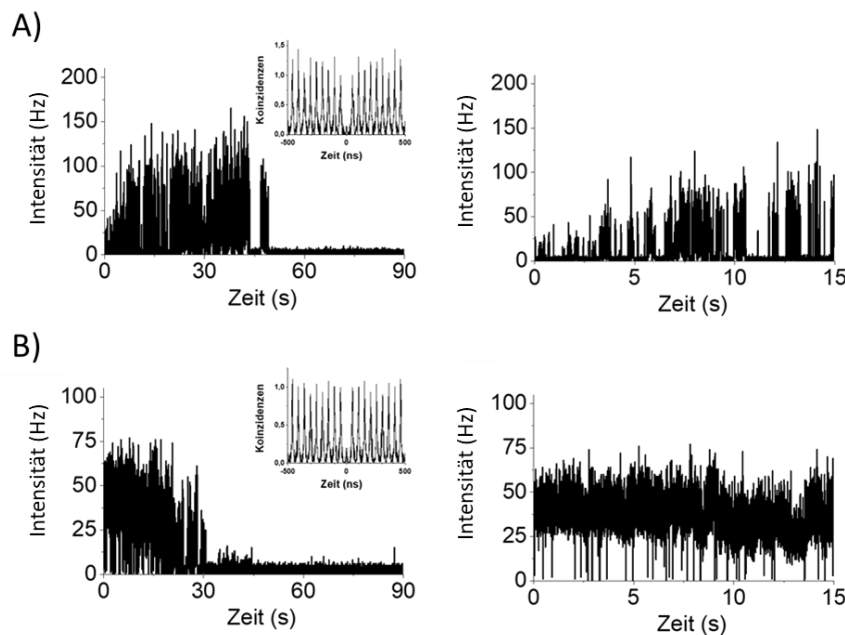
die Fluoreszenz der Farbstoffe nach wenigen Sekunden zum Erliegen kommt (Abb. 31 A). Hierbei weist die komplette Fluoreszenzintensitätsspur einen Photonenkoinzidenzwert zum Zeitpunkt  $t = 0$  von  $\sim 0,73 \pm 0,21$  auf. Die jeweiligen Photozerstörungsstufen weisen dabei einen Rückgang der Photonenkoinzidenzwerte mit steigender Photozerstörung auf. So zeigt die Photonenkoinzidenz zum Zeitpunkt  $t = 0$  vor der ersten Fluoreszenzintensitätsreduktion (Abb. 31 B (grün)) einen Wert von  $\sim 1,1 \pm 0,24$ , vor der zweiten Fluoreszenzintensitätsreduktion (Abb. 31 B (blau)) einen Wert von  $\sim 0,77 \pm 0,27$ , vor dem dritten Fluoreszenzintensitätsrückgang (Abb. 31 B (orange)) einen Wert von  $\sim 0,49 \pm 0,01$  und vor dem letzten Einbruch der Fluoreszenzintensität (Abb. 31 B (magenta)) einen Photonenkoinzidenzwert zum Zeitpunkt  $t = 0$  von  $\sim 0,19 \pm 0,02$ . Dieses Verhalten des Fluoreszenzsignals wurde lediglich für den Kopplungsgrad  $\sim 1,1$ ,  $\sim 2,1$  und in Ausnahmefällen auch für den Kopplungsgrad  $\sim 4,1$  beobachtet. Für den Kopplungsgrad von  $\sim 8,3$  konnte eine solche stufenweise Reduktion des Fluoreszenzsignals nicht registriert werden. Allerdings zeigten höhere Kopplungsgrade unter troloxhaltigen Pufferbedingungen in Ausnahmefällen auch eine starke Fluktuation der Fluoreszenzsignals zu Beginn der Messung (Abb. 31 C und D) und damit ein ähnliches Verhalten der Fluoreszenz wie unter thiolhaltigen Pufferbedingungen. Die Photonenkoinzidenzen zum Zeitpunkt  $t = 0$  wiesen hierbei über die gesamte Intensitätsspur mit Werten von  $\sim 0,45 \pm 0,11$  für den Kopplungsgrad  $\sim 4,1$  (Abb. 31 C) bzw.  $\sim 0,69 \pm 0,14$  für den Kopplungsgrad  $\sim 8,3$  (Abb. 31 D) vergleichsweise niedrige und zum Kopplungsgrad  $\sim 2,1$ , unter dieser Pufferbedingung, relativ vergleichbare Werte auf.



**Abbildung 31: Fluoreszenzintensitätszeitserien und deren Photonenkoinzidenzen einzelner Ausnahmefälle höherer Kopplungsgrade in Troloxpuffer.** A) Stufenweise Photozerstörung der Emitter des Kopplungsgrades  $\sim 4,1$  unter Troloxbedingungen (pH 7,4), sowie das dazugehörige vereinfachte Photonenkoinzidenzdiagramm über die gesamte Zeit des Fluoreszenzsignals. Die jeweiligen Stufen der Photozerstörung sind farblich gekennzeichnet. B) Vereinfachte Photonenkoinzidenzdiagramme vor der jeweiligen Reduktion des Fluoreszenzsignals, die Balken zum Zeitpunkt  $t = 0$  orientieren sich farblich an die Zahl der Photozerstörungsstufe aus A). C) Starke Fluktuation des Fluoreszenzsignals eines Antikörpers mit dem Kopplungsgrad  $\sim 4,1$  unter troloxhaltigen Pufferbedingungen (pH 7,4), sowie dessen vereinfachtes Photonenkoinzidenzdiagramm berechnet aus der gesamten Zeit des Fluoreszenzsignals. D) Fluktuationsverhalten der Fluoreszenzsignals eines Antikörpers mit dem Kopplungsgrad  $\sim 8,3$  unter Troloxbedingungen (pH 7,4) und dessen simplifiziertes Photonenkoinzidenzdiagramm über die gesamte Fluoreszenzzeit als Einschub. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Während dieses fluktuierende Fluoreszenzverhalten höherer Kopplungsgrade eher die Ausnahme unter troloxhaltigen Pufferbedingungen darstellt, zeigen Messungen der Fluoreszenzintensität unter thiolhaltigen Pufferbedingungen für höhere Kopplungsgrade oftmals ein starke Anhäufung schnell alternierender Fluoreszenzsignale während den ersten Sekunden der Aufnahme. Einige Beispiele zu den Kopplungsgraden  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  unter dieser Pufferbedingung sind in Abbildung 32 aufgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass die fluktuierenden Fluoreszenzsignale des Kopplungsgrades  $\sim 4,1$  hier bis zu 50 Sekunden und für den Kopplungsgrad  $\sim 8,3$  hier nahezu 30 Sekunden lang zu beobachten sind, bevor die Fluoreszenzereignisse abnehmen und zum Erliegen kommen. Auch die Fluoreszenzintensitäten zeigen eine Fluktuation, wobei die Intensität des Kopplungsgrades  $\sim 4,1$  über die Zeit eher etwas ansteigt, während die Fluoreszenzintensität des Kopplungsgrades

~ 8,3 über die Zeit der Signaldetektion etwas abnimmt, bevor das Signal in beiden Fällen zum Erliegen kommt.



**Abbildung 32: Anhäufung schnell fluktuierender Fluoreszenzereignisse höherer Kopplungsgrade unter Thiolbedingungen.** A) Zeitliches Fluoreszenzsignal des Kopplungsgrades ~ 4,1 unter Thiolbedingungen (pH 7,4) mit dem entsprechenden Photonenkoinzidenzsignal berechnet über die gesamte Länge der Aufnahme. Ein vergrößerter Bereich der ersten 15 Sekunden dieser Aufnahme ist im rechten Abschnitt dargestellt, der stark fluktuierende Fluoreszenzsignale und –intensitäten zeigt. B) Fluoreszenzsignalverfolgung des Kopplungsgrades ~ 8,3 unter thiolhaltigen Pufferbedingungen (pH 7,4), sowie dessen Photonenkoinzidenzdiagramm über die gesamte Zeit der Fluoreszenzsignaldetektion. Im rechten Abschnitt ist wiederum eine vergrößerte Abbildung der ersten 15 Sekunden dargestellt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 1 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Dabei zeigten sich durchschnittliche Photonenkoinzidenzen von  $\sim 0,16 \pm 0,01$  für den Kopplungsgrad  $\sim 4,1$  bzw.  $\sim 0,08 \pm 0,01$  für den Kopplungsgrad  $\sim 8,3$  und damit deutlich niedrigere Werte als bei den Messungen in Abbildung 30. Die Werte in Abbildung 32 sind vergleichbar mit Werten niedriger Kopplungsgrade unter diesen Pufferbedingungen.

### 4.3 Analyse und biologische Anwendung abstandsabhängiger photophysikalischer Phänomene von Cyaninfarbstoffen unter *d*STORM-Bedingungen mittels DNA-Origami und Rezeptoren

Im Folgenden werden alle Ergebnisse der Analysen des abstandsabhängigen photophysikalischen Verhaltens von Cyaninfarbstoffen unter *d*STORM-Bedingungen aufgeführt. Hierbei wurden alle Messungen zur DNA-PAINT Methode von der Mara Meub am

---

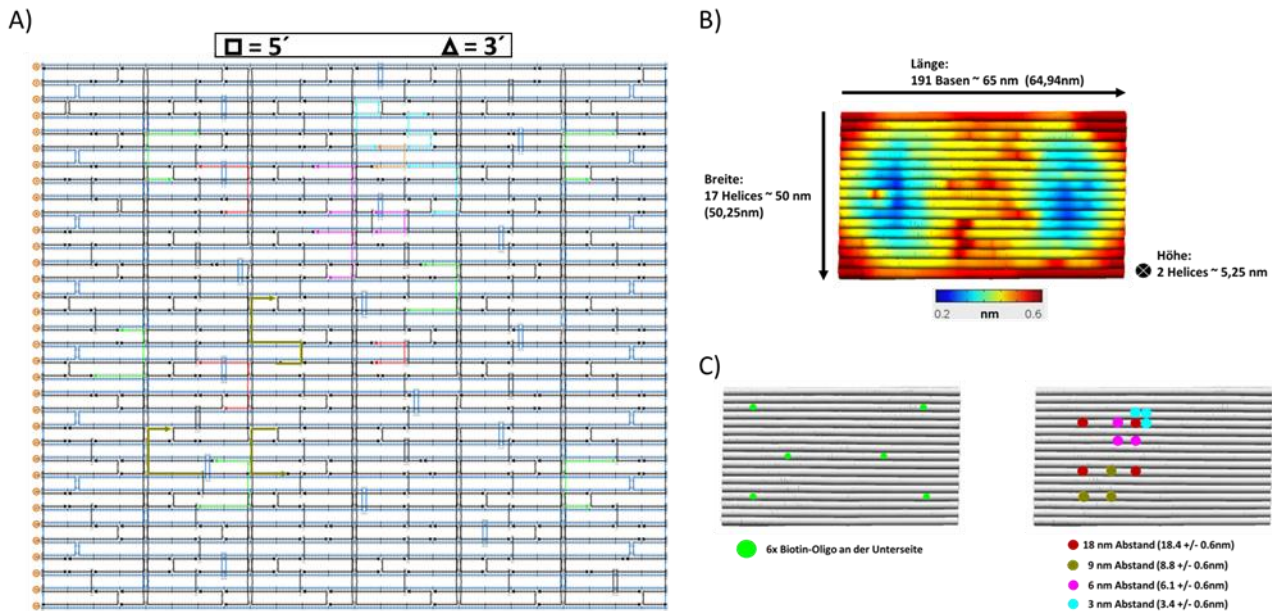
Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt. Des Weiteren wurden alle Messungen zur Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) in der Zentralen Abteilung für Mikroskopie am Biozentrum der Julius-Maximilians Universität Würzburg von Daniela Bunsen und Anne Krügl unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Stigloher durchgeführt. Sämtliche Präparationen und *d*STORM Messungen von Rezeptoren wurden von Alexander Kuhlemann am Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg durchgeführt.

#### **4.3.1 Herstellung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte**

Mithilfe des Computerprogrammes caDNAo 2.2.0 wurde ein Rechteck mit einer Breite von  $\sim 50$  nm, einer Länge von  $\sim 65$  nm und einer Höhe von  $\sim 5$  nm simuliert [64, 65]. Hierbei wurden mithilfe einer Gitternetzstruktur jeweils 17 Helices, bestehend aus 191 Basen, für die Oberseite und die Unterseite des Rechtecks simuliert, um die zuvor erwähnten Dimensionen des Rechtecks zu erzielen. Für die Visualisierung dieser Animation, wurde das Computerprogramm zur Gestaltung von dreidimensionalen DNA-Origami Strukturen, in das Animationsprogramm Autodesk Maya 2012 implementiert. Die Gestaltung des DNA-Origami Konstruktes ist in Abbildung 33 aufgeführt. Als Gerüststrang des DNA-Origami Konstruktes wurde die zirkuläre einzelsträngige Bakteriophagen-DNA p7560 aus einem M13mp18 Derivat (tilibit nanosystems, M1-32) verwendet und in das Computerprogramm, für die Simulation der nötigen kurzen Gegenstränge, eingegeben. Die Länge und die Gestaltung dieser Gegenstränge wurde manuell überprüft und optimiert. Die Sequenzen der Gegenstränge wurden als Textdatei exportiert. Die gesamten Sequenzen und die Simulation des DNA-Origami Rechtecks wurden anschließend exportiert und für Stabilitätsanalysen mittels der online-Plattform CanDo genutzt (Abb. 33 B) [66, 67]. Anschließend wurden 6 kurze Gegenstrangsequenzen selektiert, die an der Bodenplatte der DNA-Origami Konstrukte mit Biotin modifiziert werden sollten (Abb. 33 A und 33 C). Des Weiteren wurden an der Oberseite des DNA-Origami Konstruktes jeweils 4 Sequenzen selektiert, die terminal mit Cyaninfarbstoffen bzw. TCO modifiziert werden sollten, um Modifikationsabstände von 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm zu generieren (Abb. 33 A und 33 C). Hiermit wurden 4 identische DNA-Origami Rechtecke in den zuvor erwähnten Dimensionen gestaltet, die jeweils 4 Cyaninfarbstoffe bzw. TCO-



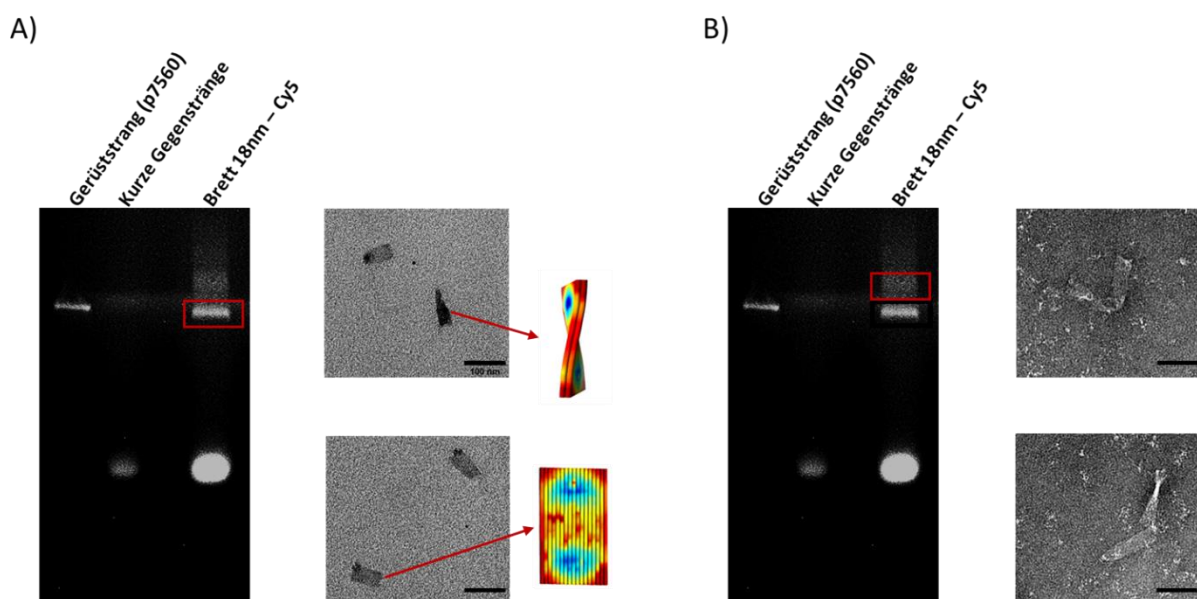
Modifikationen in einer Distanz von 18 nm, 9 nm, 6 nm oder 3 nm an der Oberseite des Konstruktes tragen. Die jeweils selektierten Sequenzen wurden anschließend mit der jeweiligen Modifikation kommerziell erworben. Alle weiteren Sequenzen wurden unmodifiziert erworben.



**Abbildung 33: Gestaltung und Stabilitätssimulation des konstruierten DNA-Origami Rechtecks.** A) Ansicht aus dem Computerprogramm caDNAo 2.2.0, das hier die nötigen kurzen unmodifizierten Oligosequenzen (schwarz), die nötigen jeweils modifizierten kurzen Oligosequenzen (farblich markiert wie in C), sowie den einzelsträngigen Gerüststrang p7560 (blau) zeigt. B) Ansicht nach der Stabilitätssimulation des gestalteten DNA-Origami Rechtecks mit der frei verfügbaren Plattform CanDO. Die Schwankungen des Konstruktes in Nanometer sind farblich gekennzeichnet und reichen laut dieser Simulation von  $\pm 0,2$  nm (blau) bis maximal  $\pm 0,6$  nm (rot). Die Dimensionen des gestalteten DNA-Origami Konstruktes sind an den jeweiligen Seiten des Konstruktes beschrieben. C) Übersicht der modifizierten Positionen der Bodenplatte und der Oberseite im gestalteten DNA-Origami Rechteck. In grün sind dabei die biotinylierten Oligos an der Unterseite des DNA-Origami Rechtecks markiert, sowie die jeweiligen Positionen der Cy5 / TCO modifizierten Oligosequenzen der jeweiligen DNA-Origami Rechtecke im Abstand von 18 nm (rot), 9 nm (ockergelb), 6 nm (magenta) und 3 nm (cyan). Die Position der biotinylierten Oligonukleotidsequenzen an der Bodenplatte ist für alle distanzabhängigen DNA-Origami Konstrukte identisch.

Für das so gestaltete DNA-Origami Konstrukt wurden anschließend die optimalen Pufferbedingungen gesucht. Dabei wurden vor allem diverse Salzkonzentrationen von NaCl, MgCl<sub>2</sub>, diverse pH-Werte, sowie diverse zeitlich verschiedene Temperaturgradienten analysiert und die Erfolgsquote der korrekten Hybridisierung mithilfe von 1,5 % Agarosegelen im Hinblick auf eine klar definierte DNA-Bande abgeschätzt. Es stellte sich heraus, dass die Hybridisierung unter einem linearen Temperaturgradienten von 90 °C auf 4 °C mit  $-1$  °C/min in einem Hybridisierungspuffer aus 5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 5 mM Natriumchlorid (NaCl), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 12 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) bei einem pH-Wert von  $\sim 8,3$  eine klare DNA-Bande der DNA-

Origami Probe zeigte, die leicht unterhalb der Referenzprobe des reinen Gerüststranges p7560 läuft, sowie eine weitere leicht verschmierte Bande, die etwas oberhalb der klaren Bande zu erkennen ist. Dies ist auch in Abbildung 34 zu erkennen. Beide Banden wurden daraufhin aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert. Die aufgereinigten extrahierten DNA-Origami Proben der beiden Banden wurden anschließend zur Qualitätskontrolle mit einem Elektronenmikroskop analysiert. Es zeigte sich, dass die klare DNA-Bande vorwiegend korrekt gefaltete DNA-Origami Rechtecke, simulierter Dimensionen, aufweist, während die verschmierte Bande überwiegend größere Konstrukte diverser Formen aufwies. Dies ist in Abbildung 34 dargestellt.

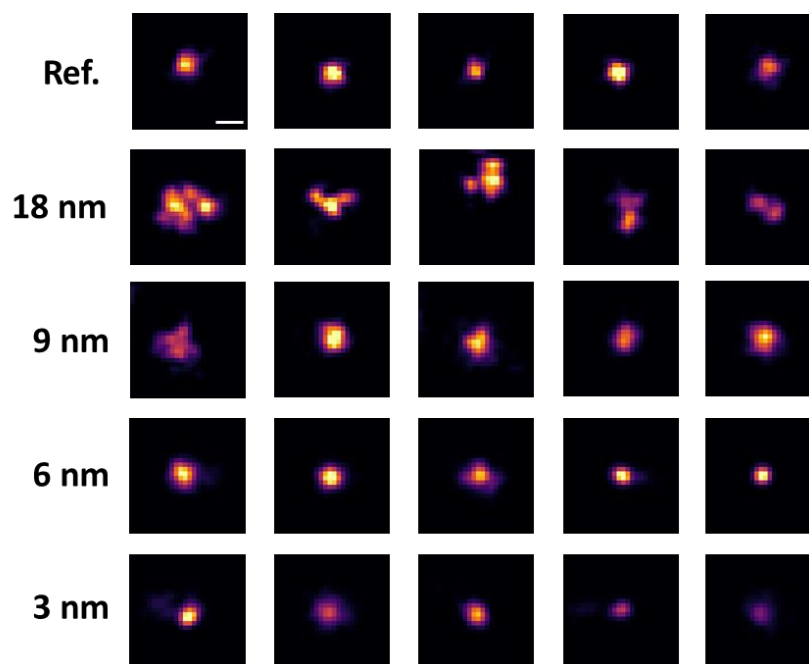


**Abbildung 34: Aufreinigung und Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte.** A) Analyse der klaren Bande der 18 nm DNA-Origami Probe im 1,5 % Agarosegel. Als Referenzproben wurde hier der Gerüststrang (p7560), sowie alle kurzen Gegenstränge (modifiziert und unmodifiziert) verwendet. Die ausgeschnittene klare Bande, die mittels Elektronenmikroskopie analysiert wurde, ist hier rot umrandet. Die jeweiligen elektronenmikroskopische Aufnahmen sind rechts daneben abgebildet. B) Analyse der oberen verschmierten Bande der 18 nm DNA-Origami Probe (rote Umrandung), sowie die jeweiligen elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Maßstabsleiste beträgt jeweils 100 nm.

Alle DNA-Origami Proben mit verschiedener Farbstoffabstände wurden unter den selben Bedingungen hybridisiert, aufgereinigt und extrahiert. Für jede Messreihe bzw. Messtag wurden die DNA-Origami Konstrukte jeweils am selben Tag hybridisiert, aufgereinigt und für die jeweiligen Messungen auf gereinigten präparierten Glasoberflächen immobilisiert.

### 4.3.2 Einzelmolekülanalysen der DNA-Origami Konstrukte

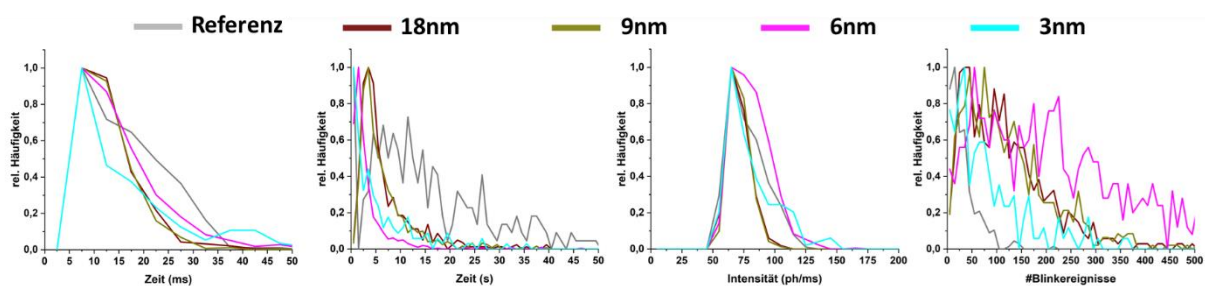
Im folgendem wurden die DNA-Origami Konstrukte mit unterschiedlichen Farbstoffabständen sowohl im Weitfeld mittels der Methoden *d*STORM und DNA-PAINT, als auch konfokal im Hinblick auf den zeitlichen Intensitätsverlauf der Emission der Emitter, den Photonenkoinzidenzen und den Fluoreszenzlebenszeiten analysiert. Als Referenzstruktur wurde ein DNA-Origami Rechteck hergestellt, das anstelle von vier Cy5 Emitter im Abstand von 18 nm nur einen Cy5 Farbstoff trug und die restlichen Cy5 modifizierten Oligosequenzen durch unmodifizierte Sequenzen ersetzt wurden. Analysen der *d*STORM Aufnahmen zeigten, dass der Farbstoffabstand von  $\sim 18$  nm mit dieser Methode der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie sehr gut aufzulösen ist. Hierbei konnten Interfluorophordistanzen von  $\sim 19,3 \text{ nm} \pm 2,9 \text{ nm}$  gemessen werden. Eine Auflösung der Farbstoffabständen ab  $\sim 9$  nm ist mit dieser Methode nicht mehr möglich, da die Lokalisationswolken deutlich überlappen. Des Weiteren zeigte sich bei den Farbstoffabständen von  $\sim 18$  nm, dass nur ein geringer Teil der hergestellten DNA-Origami Rechtecke jeweils vier Cy5 Farbstoffe trägt, wohingegen oftmals nur drei oder zwei Emitter zu erkennen waren bzw. lokalisiert werden konnten. In Abbildung 35 ist das Spektrum der lokalisierten Emitter der diversen DNA-Origami Rechtecke, gemessen unter der Mikroskopiemethode *d*STORM, dargestellt.



**Abbildung 35: *d*STORM Rekonstruktion der DNA-Origami Rechtecke diverser Farbstoffabstände.** Darstellung der rekonstruierten *d*STORM Aufnahmen der hergestellten DNA-Origami Rechtecke, die im Abstand von  $\sim 18$  nm,  $\sim 9$  nm,  $\sim 6$  nm und  $\sim 3$  nm jeweils mit vier Cy5 modifizierte Oligonukleotidsequenzen hybridisiert sind, sowie dessen Referenzstruktur, die nur mit einer Cy5 modifizierten Oligonukleotidsequenz hybridisiert ist. Die Messungen wurden in 100 mM MEA-haltigen Puffer (pH 7,4) bei einer Belichtungszeit von 5 ms und einer

Anregungsleistung von  $\sim 5 \text{ kW/cm}^2$  bei 641 nm im EPI Ausleuchtungsmodus durchgeführt. Für die Rekonstruktion wurden jeweils drei Einzelbilder mittels ImageJ aufsummiert und dieser Film (Integrationszeit pro Einzelbild 15 ms) mittels ThunderSTORM rekonstruiert. Die Maßstabsleiste beträgt 30 nm.

Während die rekonstruierten Daten der DNA-Origami Rechtecke mit vier Cy5 Farbstoffen im Abstand von 3 nm relativ große Lokalisationsverteilungen zeigten, zeigte die Referenz, die nur einen Cy5 Fluoreszenzfarbstoff trägt, deutlich kleinere Lokalisationswolken. Alle DNA-Origami Aufnahmen unter *d*STORM Bedingungen wurden dabei mit 5 ms (200 Hz) Integrationszeit im Belichtungsmodus EPI aufgenommen. Für die Analyse der DNA-Origami Rechtecke in Abbildung 35 wurden dabei mittels ImageJ jeweils 3 Einzelbilder der jeweiligen Aufnahmen zusammengefügt, sodass ein Einzelbild der jeweiligen Aufnahmen eine Integrationszeit von 15 ms (66,67 Hz) aufwies. Als weitere Analyse wurden die *d*STORM Aufnahmen der diversen DNA-Origami Konstrukte im Hinblick auf die Fluoreszenzzeit ( $\tau_{AN}$ ), die nicht fluoreszierende Zeit ( $\tau_{AUS}$ ), die Intensität ( $I_{AN}$ ) und die Anzahl der Blinkereignisse jeweils aller Emitter eines jeweiligen DNA-Origami Rechteckes analysiert. Hierbei wurden die Aufnahmen mit einer Integrationszeit von 5 ms (200 Hz) mittels rapidSTORM und der Ausgabeoption "track emission", zur zeitlichen Verfolgung einzelner Lokalisationen, ausgewertet und untersucht. In Abbildung 36 und Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Analyse als Mittelwert aus jeweils drei *d*STORM Aufnahmen der jeweiligen DNA-Origami Konstrukte aufgeführt. Hierbei wurden alle Aufnahmen auf die jeweilige Dichte der rekonstruierten Emitter bzw. DNA-Origami Rechtecke und anschließend, zur Veranschaulichung, auf ihren jeweiligen maximalen Wert normiert.



**Abbildung 36: Zeitliche Analyse der Emitterfluoreszenz der DNA-Origami Rechtecke unter *d*STORM Bedingungen.** Die vier Graphen zeigen von links nach rechts die relative Häufigkeit der Fluoreszenzzeit, der Zeit im nicht – fluoreszierendem Zustand, der Emissionsintensität und der Blinkhäufigkeit der Emitter eines DNA-Origami Rechteckes unterschiedlicher Farbstoffabstände. Die jeweiligen Farbstoffabstände sind dabei farblich gekennzeichnet. Die Klasseneinteilung der Anzeiten, Auszeiten, Intensitäten und der Blinkereignisse beträgt 5 ms, 1 s, 10 Photonen/ms bzw. 10 Ereignisse.

**Tabelle 5: Zeitliche Analyse der Emitterfluoreszenzsignale mehrfach markierter DNA-Origami Rechtecke unterschiedlicher Abstände.** Die Analyse erfolgte mit einem Beobachtungsradiusparameter von  $\sim 100 \text{ nm}$  im Hinblick auf die jeweilige Fluoreszenzintensität der detektierten Emitter ( $I_{AN}$ ) in Photonen/ms, der jeweiligen

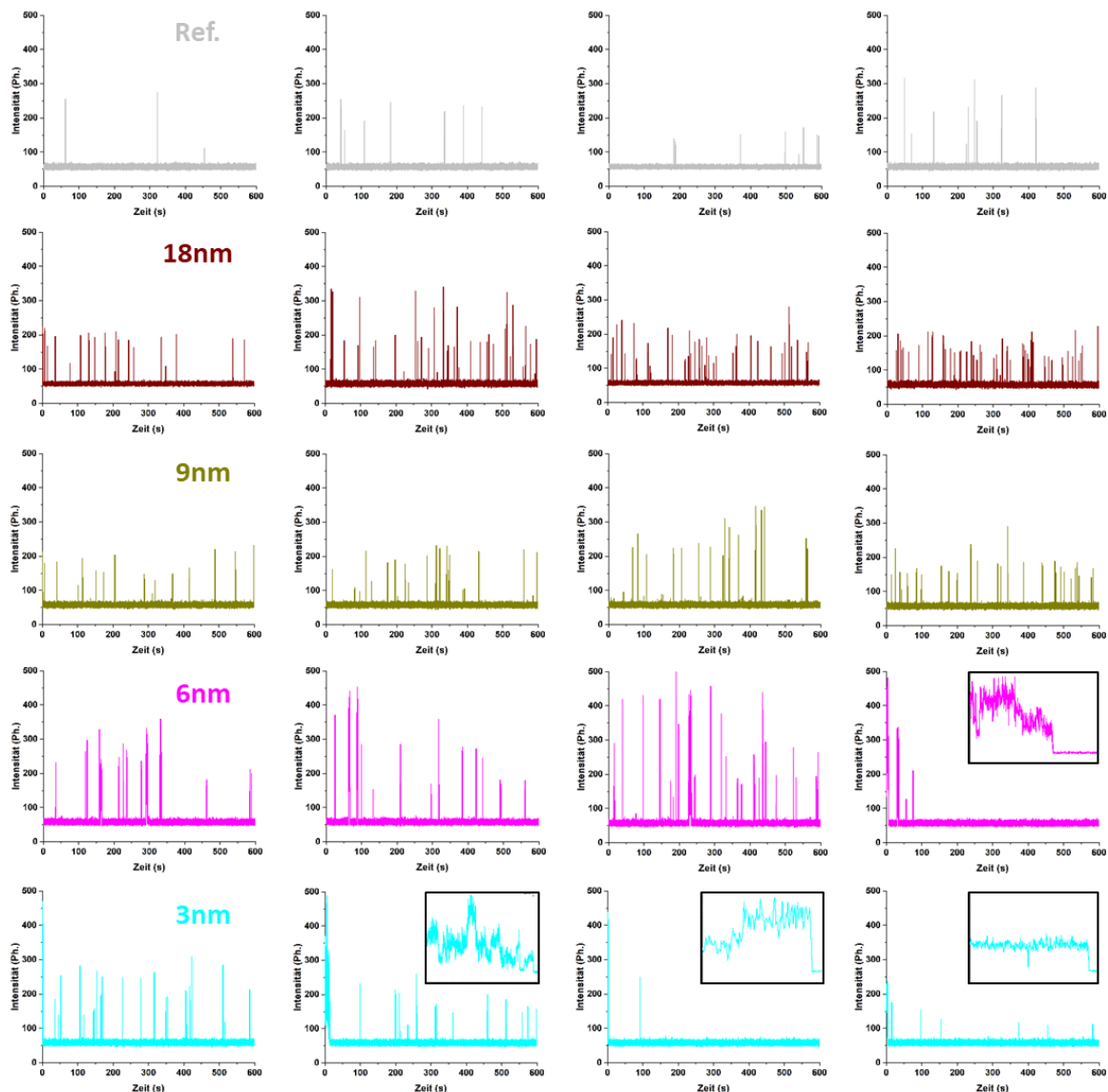
Detektionszeit des Signals ( $\tau_{AN}$ ) in ms, der Zeit zwischen den jeweiligen Lokalisationsereignissen der Emitter im Beobachtungsradius ( $\tau_{AUS}$ ) in Sekunden (s) und die jeweiligen Blinkereignisse einzelner Emitter im Beobachtungsradius. Die jeweiligen Messungen wurden bei einer Integrationszeit von 5 ms (200 Hz) für jeweils 10 Minuten mit einer Anregungsleistung von  $\sim 5 \text{ kW/cm}^2$  bei 641 nm in PBS Puffer mit 100 mM MEA (pH 7,4). Die jeweiligen analysierten Daten wurden dabei histogrammiert (Abb. 36) und die jeweiligen durchschnittlichen Parameter mit ihrer Standardabweichung (SA) aufgelistet.

| Proben   | $\tau_{AN}$ (ms) |        | $\tau_{AUS}$ (s) |        | $I_{AN}$ (Photonen/ms) |        | Blinkereignisse   |        |
|----------|------------------|--------|------------------|--------|------------------------|--------|-------------------|--------|
|          | Mittelwert       | Median | Mittelwert       | Median | Mittelwert             | Median | Mittelwert        | Median |
| Referenz | $16,0 \pm 8,1$   | 14,8   | $18,0 \pm 17,9$  | 12,9   | $77,2 \pm 14,8$        | 73,2   | $32,2 \pm 29,4$   | 23     |
| 18 nm    | $13,0 \pm 6,1$   | 11,6   | $7,4 \pm 9,2$    | 4,8    | $71,1 \pm 9,1$         | 69,6   | $120,3 \pm 91,2$  | 103    |
| 9 nm     | $12,6 \pm 5,5$   | 11,4   | $7,7 \pm 12,2$   | 4,8    | $71,5 \pm 8,4$         | 70,1   | $123,7 \pm 82,6$  | 101    |
| 6 nm     | $15,7 \pm 9,8$   | 13,3   | $3,4 \pm 4,6$    | 2,0    | $81,1 \pm 15,7$        | 78,9   | $294,2 \pm 288,2$ | 216    |
| 3 nm     | $22,8 \pm 32,8$  | 14     | $6,4 \pm 8,7$    | 3,4    | $81,1 \pm 19,8$        | 77,3   | $93,1 \pm 108,4$  | 62     |

Hierbei zeigt sich, dass sowohl die DNA-Origami Referenzkonstrukte, als auch die Farbstoffabstände 18 nm – 3 nm mit  $\sim 70 - 79$  Photonen / ms (Median) eine relativ ähnliche Fluoreszenzintensität aufweisen, wobei die Cy5 Farbstoffe im Abstand von 3 nm und 6 nm eine etwas breitere Verteilung zu höheren Intensitäten aufweisen (Abb. 36). Dies zeigten ebenso im Ansatz die Referenzkonstrukte, allerdings nicht in der Breite wie die Abstände 6 nm und 3 nm. Die Zeit, die die Emitter im fluoreszierenden detektionsfähigen Zustand verweilen ist dabei mit  $\sim 12,6 \text{ ms} \pm 5,5 \text{ ms}$  (SA) –  $\sim 16,0 \text{ ms} \pm 8,1 \text{ ms}$  (SA) sowohl bei den Fluorophorabständen 18 nm, 9 nm und 6 nm, also auch beim Referenzkonstrukt, sehr ähnlich. Lediglich der Anzustand der Emitter der 3 nm DNA-Origami Konstrukte ist mit  $\sim 22,8 \text{ ms} \pm 32,8 \text{ ms}$  (SA) höher. Im Bezug auf die breitere Verteilung der Anzustände des 3 nm DNA-Origami Konstruktes aber dennoch ähnlich zur Referenzstruktur und den restlichen DNA-Origami Konstrukten. Der Auszustand des Emitters am DNA-Origami Referenzkonstrukt ist mit  $\sim 18,0 \text{ s} \pm 17,9 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 12,9 \text{ s}$ ) am längsten, wobei sich hier eine sehr breite Verteilung der Auszeiten der Referenzstrukturen zeigt (Abb. 36). Im Vergleich dazu liegt die Auszeit der 18 nm und 9 nm mit  $\sim 7,4 \text{ s} \pm 9,2 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 4,8 \text{ s}$ ) bzw.  $\sim 7,7 \text{ s} \pm 12,2 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 4,8$ ) ungefähr 2,4 – 2,7-fach niedriger. Die Auszeit der 6 nm DNA-Origami Konstrukte ist mit  $\sim 3,4 \text{ s} \pm 4,6 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 2 \text{ s}$ ) am niedrigsten. Diese Zeit steigt für die 3 nm DNA-Origami Konstrukte auf  $\sim 6,4 \text{ s} \pm 8,7 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 3,4 \text{ s}$ ) an und liegt damit bei ähnlichen Mittelwerten wie die DNA-Origami Konstrukte mit 18 nm und 9 nm Farbstoffabstände. In Abbildung 36 ist dieser Unterschied der Auszeit deutlicher zu sehen als in Tabelle 5. Hierbei ist zu erkennen, dass die DNA-Origami Referenzkonstrukte eine sehr breite Verteilung der

Auszeiten besitzt, wohingegen die Zeit der Auszustände der Emitter für 18 nm und 9 nm im Vergleich dazu erniedrigt ist und auf relativ ähnliche Werte im Maximum abnimmt. Die Zeit der Auszustände der Emitter sinkt für Farbstoffdistanzen von 6 nm und 3 nm weiter ab und liegt dabei für die 3 nm DNA-Origami Konstrukte im Maximum sehr nahe am Wert 0. Dies ist in der Tabelle mit der Verteilung der Mittelwerte nicht zu erkennen (Tab. 5). Ähnlich verhält es sich mit den Blinkereignissen der Emitter an den DNA-Origami Konstrukten. Dort weist die Referenzstruktur mit einem Mittelwert von  $\sim 32,2 \pm 29,4$  (SA) (Median:  $\sim 23$ ) den geringsten Wert auf. Die 18 nm und 9nm DNA-Origami Konstrukte weisen mit  $\sim 120,3 \pm 91,2$  (SA) (Median:  $\sim 103$ ) bzw.  $\sim 123,7 \pm 82,6$  (SA) (Median:  $\sim 101$ ) ähnliche Werte untereinander auf, der  $\sim 3,75 - 4,5$ -fach höher liegt als der Wert der Blinkereignisse der Referenzstrukturen. Die 6nm DNA-Origami Konstrukte weisen eine sehr breite Verteilung der Blinkereignisse auf. Dort liegt der Mittelwert der Blinkereignisse bei  $\sim 294,2 \pm 288,2$  (SA) (Median:  $\sim 216$ ) und weist damit die höchste Anzahl an Blinkereignissen pro 4-fach markiertem DNA-Origami Rechteck auf (Abb. 36). Die Anzahl an Blinkereignissen fällt bei den 3 nm DNA-Origami Konstrukten auf  $\sim 93,1 \pm 108,4$  (SA) (Median:  $\sim 62$ ) stark ab und liegt dabei zwischen den Werten der Blinkereignisse der DNA-Origami Referenzstrukturen und den Farbstoffabständen 18 nm und 9 nm. Betrachtet man, ergänzend dazu, die Fluoreszenzintensität einzelner Fluoreszenzpunkte der Rohaufnahme über die Zeit, die unter *d*STORM-Bedingungen im Weitfeld gemessen wurden, fällt auf, dass die DNA-Origami Konstrukte mit einem Farbstoffabstand von 18 nm und 9 nm im Vergleich zur DNA-Origami Referenzstruktur, die nur einen Cy5 Farbstoff trägt, deutlich mehr Blinkereignisse über die gesamte Aufnahmezeit aufweisen. Der zeitliche Intensitätsverlauf der DNA-Origami Referenzkonstrukte, zeigt dabei ein charakteristisches Blinkverhalten eines einzelnen Farbstoffes unter *d*STORM-Bedingungen. Ähnlich verhält es sich mit dem DNA-Origami Konstrukt, das einen Farbstoffabstand von 6 nm aufweist. Daneben zeigt dieser Farbstoffabstand beim Betrachten der zeitlichen Fluoreszenzintensität häufigere Blinkereignisse als die Referenzstruktur. Jedoch ist auffällig, dass vor allem zu Beginn der Aufnahme vereinzelt ein schnelles "Flackern" der Fluoreszenzintensität bei diesem Farbstoffabstand beobachtet werden konnte. Diese Fluoreszenzpunkte zeigen in den Rohaufnahmen nach erfolgtem "Flackern" nur noch vereinzelt ein Blinkverhalten bzw. kommt es nicht zu weiteren häufigen Blinkereignissen während der restlichen Aufnahmezeit. Das Blinkverhalten dieser Konstrukte ist dann ähnlich zu dem Blinkverhalten der DNA-Origami Referenzstrukture. Dies ist auch teilweise in der Analyse des zeitlichen

Fluoreszenzintensitätsverhaltens zu beobachten, was in Abbildung 37 aufgeführt ist. Dieses Verhalten des “Flackern” der Fluoreszenzintensität ist bei einem Farbstoffabstand von 3 nm vorwiegend zu beobachten und nur selten kommt es zu einem Auftreten vereinzelter Blinkereignisse der Emitter. In Abbildung 37 ist ein Spektrum des zeitlichen Fluoreszenzverhaltens aller gemessenen DNA-Origami Konstrukte aufgeführt, die unter *d*STORM Bedingungen im Weitfeld gemessen wurden.

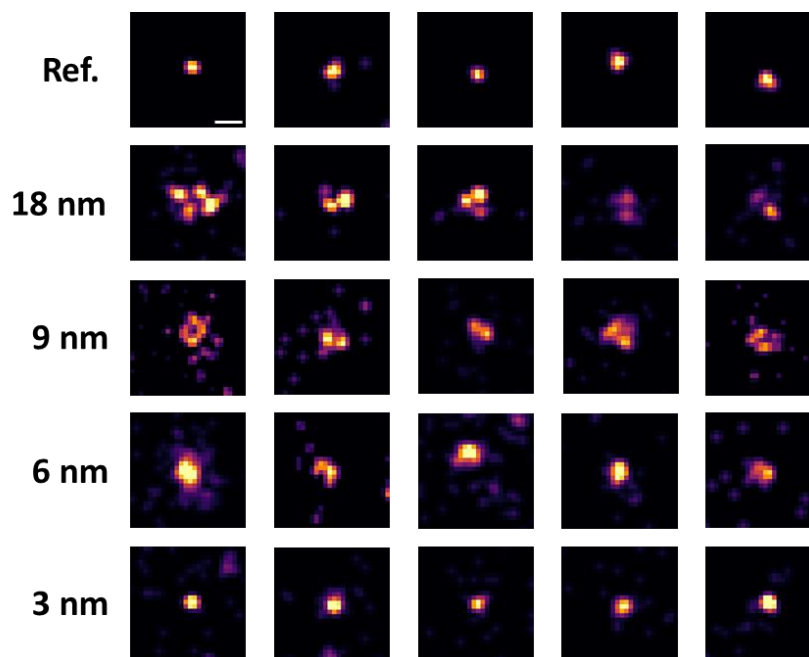


**Abbildung 37: Zeitliche Intensitätstrajektorien der *d*STORM-Aufnahmen im Weitfeld.** Darstellung des Fluoreszenzsignals einzelner DNA-Origami Konstrukte gemessen im Weitfeld unter *d*STORM-Bedingungen im EPI Belichtungsmodus bei 641 nm mit einer Anregungsleistung von  $\sim 5 \text{ kW/cm}^2$  für 10 min und einer Integrationszeit von 5 ms. Die jeweiligen Werte der Intensitäten beziehen sich auf das Signal pro Einzelbild der Aufnahme (Klasseneinteilung 5ms), diese sind in Photonen aufgetragen und die jeweiligen DNA-Origami Konstrukte mit diversen Farbstoffabständen sind farblich gekennzeichnet. Die Intensitätstrajektorien wurden mit ImageJ und der zeitlichen Verfolgung des Intensitätssignals einzelner Pixel der Rohaufnahme erstellt. Die vergrößerten Ausschnitte in den Intensitätstrajektorien der DNA-Origami Konstrukte mit einem Farbstoffabstand von 6 nm und 3 nm zeigen das Intensitätsverhalten des “Flackern” zu Beginn der jeweiligen Messung.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Fluoreszenzintensitäten pro Einzelbild (Integrationszeit 5 ms) der Aufnahme der Referenz-, der 18 nm - und der 9 nm - Probe, bis auf einzelne Ausreißer, ein ähnliches bzw. vergleichbares Intensitätsniveau besitzen. Im Vergleich dazu gibt es bei den DNA-Origami Proben mit 6 nm bzw. 3 nm Farbstoffabstand starke Abweichungen in der Fluoreszenzintensität, wobei die Fluoreszenzintensität der Blinkereignisse der 6 nm DNA-Origami Probe höher liegt als bei den Fluoreszenzintensitätstrajektoren der restlichen DNA-Origami Konstrukte. Die 3 nm DNA-Origami Proben zeigen dahingegen ein eher etwas niedrigeres Fluoreszenzintensitätsverhalten der Blinkereignisse bzw. ein ähnliches Intensitätsniveau wie die Referenz-, 18 nm - und 9 nm - Probe. Auffällig ist, dass bei einem "Flackern" der Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung, was vor allem bei den DNA-Origami Strukturen mit einem Farbstoffabstand von 3 nm auftritt, das Fluoreszenzsignal wesentlich höher liegt als die Intensitäten der Blinkereignisse während der restlichen Aufnahme des Konstruktes und häufig auch dort die höchsten Intensitätssignale aller Intensitätstrajektoren der DNA-Origami erreicht werden. Im Vergleich zu den Aufnahmen der dSTORM-Methode wurden DNA-PAINT Messungen von Mara Meub durchgeführt. Dazu wurden DNA-Origami Strukturen mit den selben Modifikationsabständen hergestellt, wobei hier keine Farbstoff modifizierten Gegenstränge für die Hybridisierung des DNA-Origami Rechtecks verwendet wurden, sondern anstelle der Farbstoffmodifikation eine Oligosequenz via TCO-Tet Klick-Chemie als Andockstelle für die mit Farbstoff modifizierten DNA-PAINT Gegenstränge eingebracht wurde. Als Gegenstränge für diese DNA-PAINT tauglichen DNA-Origami Konstrukte wurden 5' - Cy3B modifizierte Gegenstränge zu den am DNA-Origami angebrachten Andocksträngen benutzt (5' - 3': Cy3B - CTA GAT GTA T) (biomers.net GmbH). Alle DNA-PAINT Messungen mit den DNA-Origami Konstrukten wurden bei einer Integrationszeit von 100 ms bei einer Anregungsleistung von  $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$  bei 568 nm im TIRF-Belichtungsmodus für 30 min durchgeführt. Die Konzentration des Farbstoff gekoppelten Gegenstranges betrug  $\sim 5 \text{ nM}$  in PBS mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Ein Spektrum der rekonstruierten DNA-Origami Strukturen diverser Andockstrangabstände ist in Abbildung 38 aufgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass die Referenzstrukturen jeweils nur einen Fluoreszenzpunkt zeigen, während sowohl bei einem Abstand der Andockstränge von 18 nm und 9 nm, als auch beim 6 nm teilweise bis zu vier rekonstruierte Fluoreszenzpunkte zu erkennen sind. Diese vier Fluoreszenzpunkte sind bei einem Abstand von 18 nm klar trennbar. Während bei einem Abstand von 9 nm vier



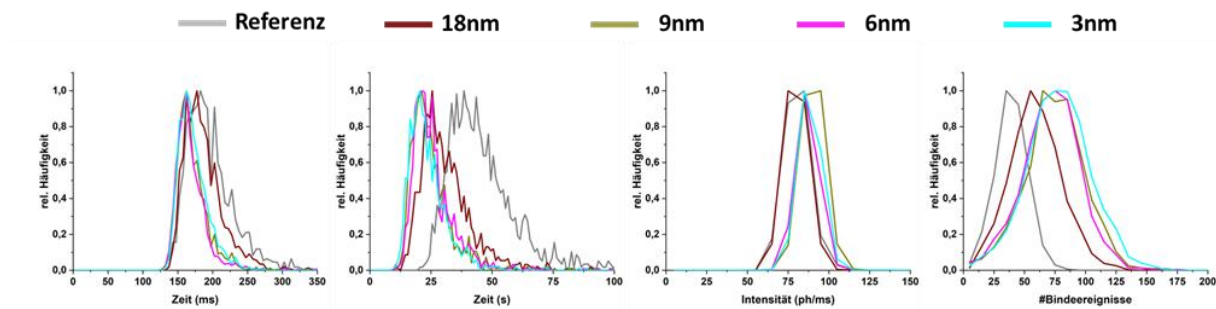
rekonstruierte Fluoreszenzpunkte noch zu erkennen sind, sind bei einem Andockstrangabstand ab 6 nm diese Fluoreszenzpunkte nicht mehr zu unterscheiden und verschwimmen teilweise stark ineinander. Hierbei konnten Interfluorophordistanzen von  $\sim 20,7 \text{ nm} \pm 3,4 \text{ nm}$  (18 nm DNA-Origami) bzw.  $\sim 13,0 \text{ nm} \pm 2,4 \text{ nm}$  (9 nm DNA-Origami) bestimmt werden. Auffällig ist, dass wie bei der Lokalisationsmikroskopiemethode *d*STORM, auch mittels DNA-PAINT überwiegend weniger als vier Fluoreszenzpunkte rekonstruiert werden können bzw. erkennbar sind. Die Mehrzahl der rekonstruierten Aufnahmen der DNA-Origami Strukturen bestehen nur aus zwei oder drei Fluoreszenzpunkten.



**Abbildung 38: Rekonstruktion der mittels DNA-PAINT gemessenen DNA-Origami Rechtecke.** Darstellung der rekonstruierten DNA-PAINT Aufnahmen der hergestellten DNA-Origami Rechtecke, die im Abstand von 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm jeweils mit 4 Andocksequenzen hybridisiert sind, sowie dessen Referenzstruktur, die nur mit einer Andockstelle hybridisiert ist. Die Messungen wurden in PBS mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,4) bei einer Belichtungszeit von 100 ms und einer Anregungsleistung von  $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$  bei 568 nm im TIRF Ausleuchtungsmodus durchgeführt. Die Rekonstruktion dieser Aufnahmen wurde mittels ThunderSTORM durchgeführt. Die Maßstabsleiste beträgt 30 nm.

Als weitere Analyse wurden diese Aufnahmen im Hinblick auf die Fluoreszenzzeit ( $\tau_{\text{AN}}$ ), die nicht fluoreszierende Zeit ( $\tau_{\text{AUS}}$ ), die Intensität ( $I_{\text{AN}}$ ) und die Anzahl der DNA-PAINT Bindeereignisse jeweils aller Emitter eines jeweiligen DNA-Origami Rechteckes analysiert. Hierbei wurden die Aufnahmen mittels rapidSTORM und der Ausgabeoption “track emission” mit einem Beobachtungsradius von  $\sim 100 \text{ nm}$ , zur zeitlichen Verfolgung einzelner Lokalisationen, ausgewertet und untersucht. In Abbildung 39 und Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Analyse als Mittelwert der jeweiligen halbstündlichen Aufnahme der jeweiligen DNA-

Origami Konstrukte aufgeführt. Hierbei wurden die Aufnahmen auf ihre jeweilige Dichte der rekonstruierten Emitter bzw. DNA-Origami Rechtecke und anschließend, zur Veranschaulichung, auf ihren jeweiligen maximalen Wert normiert.



**Abbildung 39: Zeitliche Analyse des Fluoreszenzverhaltens der Bindeereignisse der DNA-Origami Strukturen mittels DNA-PAINT.** Darstellung der relativen Häufigkeit der Fluoreszenzzeit (links), der Zeit zwischen den Bindeereignissen (zweites von links), der Emissionsintensität (zweites von rechts) und der Bindehäufigkeit (rechts) der DNA-PAINT Messungen der DNA-Origami Rechtecke diverser Andockstrangabstände. Die jeweiligen Abstände sind dabei farblich gekennzeichnet. Die Klasseneinteilung der Anzeiten, Auszeiten, Intensitäten und der Bindeereignisse beträgt 5 ms, 1 s, 10 Photonen/ms bzw. 10 Ereignisse.

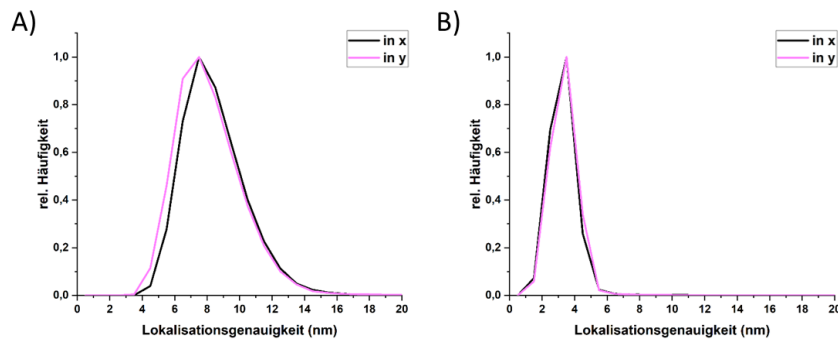
**Tabelle 6: Zeitliche Analyse der Bindeereignisse mehrfach markierter DNA-Origami Rechtecke diverser Andockstrangabstände.** Alle Analysen erfolgten in einem Beobachtungsradiusparameter von  $\sim 100$  nm in Bezug auf die jeweilige Fluoreszenzintensität während der Bindeereignisse ( $I_{AN}$ ) in Photonen/ms, der jeweiligen Detektionszeit des Signals bzw. Bindezeit ( $\tau_{AN}$ ) in ms, der Zeit zwischen den jeweiligen Lokalisationsereignissen der Emitter im Beobachtungsradius ( $\tau_{AUS}$ ) in Sekunden (s). Die jeweiligen Messungen wurden bei einer Integrationszeit von 100 ms (10 Hz) für jeweils 30 Minuten mit einer Anregungsleistung von  $\sim 1$  kW/cm<sup>2</sup> bei 568 nm in PBS Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4). Die jeweiligen analysierten Daten wurden dabei histogrammiert (Abb. 39) und die jeweiligen durchschnittlichen Parameter mit ihrer Standardabweichung (SA) aufgelistet.

| Proben   | $\tau_{AN}$ (ms) |        | $\tau_{AUS}$ (s) |        | $I_{AN}$ (Photonen/ms) |        | Blinkereignisse |        |
|----------|------------------|--------|------------------|--------|------------------------|--------|-----------------|--------|
|          | Mittelwert       | Median | Mittelwert       | Median | Mittelwert             | Median | Mittelwert      | Median |
| Referenz | 196,6 $\pm$ 35,7 | 189    | 46,5 $\pm$ 16,3  | 43,2   | 80,7 $\pm$ 7,7         | 80,5   | 38,7 $\pm$ 12,9 | 39     |
| 18 nm    | 186,2 $\pm$ 11,1 | 181    | 31,1 $\pm$ 11,1  | 29     | 79,8 $\pm$ 6,7         | 79,7   | 59,0 $\pm$ 21,0 | 58     |
| 9 nm     | 170,9 $\pm$ 22,9 | 166    | 25,2 $\pm$ 9,5   | 23,1   | 90,1 $\pm$ 6,7         | 90,0   | 74,2 $\pm$ 24,3 | 75     |
| 6 nm     | 169,8 $\pm$ 29,9 | 165    | 25,9 $\pm$ 9,3   | 23,9   | 86,8 $\pm$ 6,3         | 86,7   | 71,3 $\pm$ 23,8 | 72     |
| 3 nm     | 172,3 $\pm$ 20,9 | 168    | 23,9 $\pm$ 9,2   | 22,1   | 88,3 $\pm$ 6,5         | 88,3   | 77,8 $\pm$ 25,7 | 78     |

Dabei ist zu erkennen, dass die Referenzstruktur, mit nur einer Andockstelle für den DNA-PAINT Belichtungsstrang, sowohl mit  $\sim 38,7 \pm 12,9$  (SA) Bindeereignissen (Median:  $\sim 39$  Ereignisse) den niedrigsten Wert, also auch mit  $\sim 46,5 \text{ s} \pm 16,3 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 43,2 \text{ s}$ ) den höchsten Wert der Auszeiten aller DNA-Origami Aufnahmen mittels DNA-PAINT aufweist. Die Werte der Bindeereignisse der DNA-Origami Konstrukte mit den Abständen 9 nm, 6 nm und 3 nm sind dabei mit  $\sim 74,2 \pm 24,3$  (SA) Bindeereignissen (Median:  $\sim 75$  Bindeereignisse),  $\sim 71,3$

$\pm 23,8$  (SA) Bindeereignissen (Median:  $\sim 72$  Bindeereignisse) und  $\sim 77,8 \pm 25,7$  (SA) Bindeereignissen (Median:  $\sim 78$  Bindeereignisse) nahezu gleich und liegen damit ca. 2-fach höher als die Bindeereignisse der DNA-Origami Referenzstruktur. Die 18 nm DNA-Origamistruktur weicht in der Hinsicht der Bindeereignisse etwas von der Anzahl der Bindeereignisse der restlichen DNA-Origami Abständen ab. Dort liegt die Anzahl der Bindeereignisse mit  $\sim 59,0 \pm 21,0$  (SA) Bindeereignissen (Median:  $\sim 58$  Bindeereignisse) etwas niedriger und damit nur  $\sim 1,5$ -fach höher als die Anzahl der Bindeereignisse des DNA-Origami Referenzkonstruktes. In Abbildung 39 ist auch zu erkennen, dass die Verteilung der Bindeereignisse der 18 nm DNA-Origamistruktur geringfügig zu niedrigeren Werten verschoben ist und damit leicht zwischen den Histogrammen der Referenzstruktur und der restlichen DNA-Origami Konstrukte mit den Abständen 9 nm, 6 nm und 3 nm liegt. Ähnlich verhält es sich mit den Auszeiten bzw. den Zeiten zwischen den Bindeereignissen des Cy3B-Belichtungsstranges. Hier sind die Werte der 9 nm, 6 nm und 3 nm DNA-Origami Konstrukte mit  $\sim 25,2 \text{ s} \pm 9,5 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 23,1 \text{ s}$ ),  $\sim 25,9 \text{ s} \pm 9,3 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 23,9 \text{ s}$ ) bzw.  $\sim 23,9 \text{ s} \pm 9,2 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 22,1 \text{ s}$ ) ebenso nahezu identisch und liegen damit  $\sim 2$ -fach niedriger als die Werte der Referenzstruktur. Die DNA-Origami Struktur mit den Abständen 18 nm liegt hier wiederum mit  $\sim 31,1 \text{ s} \pm 11,1 \text{ s}$  (SA) (Median:  $\sim 29,0 \text{ s}$ ) etwas höher und damit nur  $\sim 1,5$ -fach niedriger als die entsprechenden Werte der Referenzstruktur. Ebenso ist zu erkennen, dass das entsprechende Histogramm der Zeiten zwischen den Bindeereignissen der 18 nm DNA-Origami Strukturen im Vergleich zu den Verteilungen der übrigen DNA-Origami Konstrukte unterschiedlicher Farbstoffabstände, leicht rechtsverschoben ist (Abb. 39). Dabei sind bei den DNA-PAINT Messungen aller DNA-Origami Konstrukte unterschiedlicher Abstände die Intensitäten nahezu identisch und zeigen keine großen Abweichungen. Diese liegen im Bereich von  $\sim 79,8 \text{ Ph/ms} \pm 6,7 \text{ Ph/ms}$  (SA) (Median:  $\sim 79,7 \text{ Ph/ms}$ ), für das 18 nm DNA-Origami Konstrukt, bis  $\sim 90,1 \text{ Ph/ms} \pm 6,7 \text{ Ph/ms}$  (SA) (Median:  $\sim 90,0 \text{ Ph/ms}$ ), für das DNA-Origami Konstrukt mit 9 nm Abständen. Ebenso verhält es sich mit der Bindezeit der Belichtungsstränge, die mit Cy3B markiert sind. Diesbezüglich gibt es zwischen den verschiedenen DNA-Origami Aufnahmen nur geringfügige Abweichungen. Die Werte der Bindezeiten reichen von  $\sim 169,8 \text{ ms} \pm 29,9 \text{ ms}$  (SA) (Median:  $\sim 165 \text{ ms}$ ), für das 6 nm DNA-Origami Konstrukt, bis maximal  $\sim 196,6 \text{ ms} \pm 35,7 \text{ ms}$  (SA) (Median:  $\sim 189 \text{ ms}$ ), für das DNA-Origami Referenzkonstrukt. Betrachtet man die beiden Lokalisationsmikroskopiemethoden *d*STORM und DNA-PAINT im Hinblick auf ihre Signaleinfangzeiten und die maximale Anzahl an

eingefangenen Photonen, dann ist zu erkennen, dass mit der Methode DNA-PAINT Photonen über eine wesentlich längere Zeitdauer eingefangen werden können und eine höhere Lokalisationsgenauigkeit, sowie Auflösung erreicht werden kann. Dies ist in Abbildung 40 dargestellt.

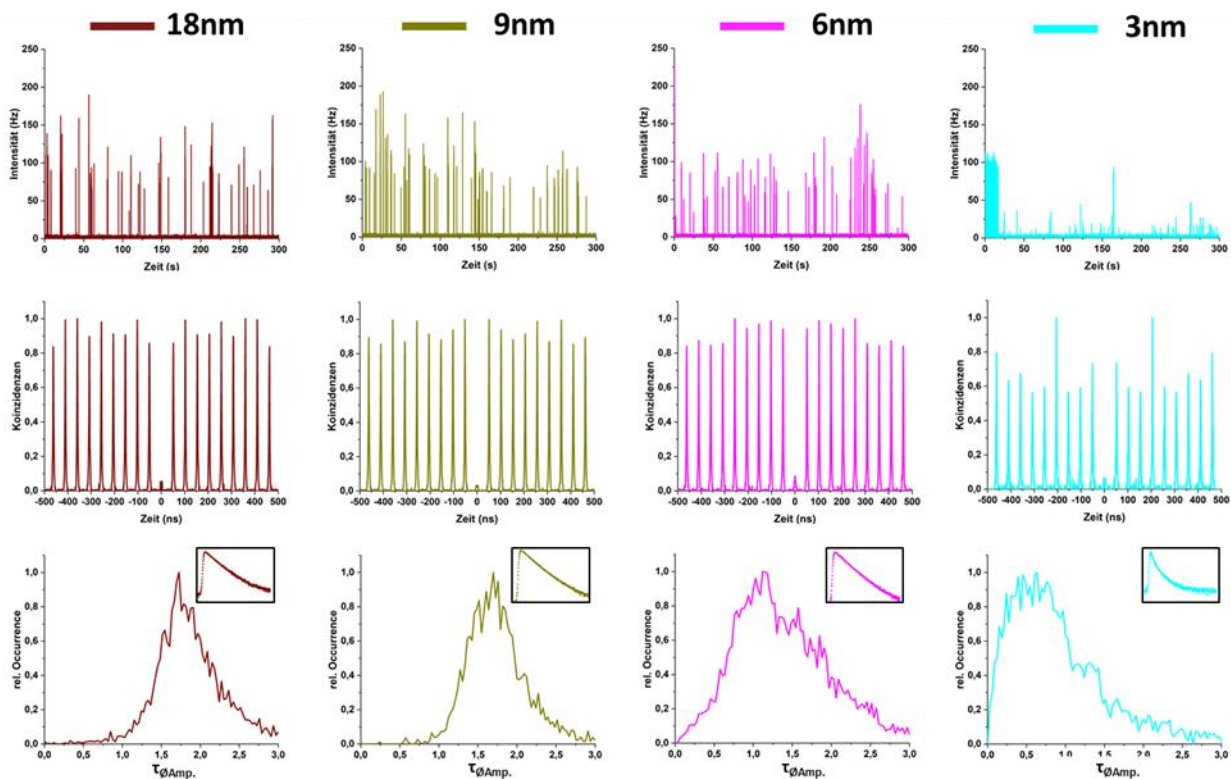


**Abbildung 40: Lokalisationsgenauigkeit der Mikroskopiemethoden *d*STORM und DNA-PAINT.** A) Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit (Klassenbreite: 1 nm) der *d*STORM – Aufnahme des 18 nm DNA-Origami Konstruktes gemessen mit einer Integrationszeit von 5 ms in 100 mM MEA (pH 7,4) mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Anregungsleistung von  $\sim 5$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm im EPI Belichtungsmodus. Zur Berechnung wurden jeweils 3 Einzelbilder zusammengefasst, was eine Integrationszeit von 15 ms entspricht. B) DNA-PAINT Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit (Klassenbreite: 1 nm) errechnet aus den Aufnahmen des 18 nm DNA-Origami Konstruktes gemessen in PBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> mit 100 ms Integrationszeit unter  $\sim 1$  kW/cm<sup>2</sup> Anregungsleistung bei 568 nm. Die Daten der Variation der mithilfe einer Gaussfunktion angepassten Punktspreizfunktion wurden mithilfe von rapidSTORM und der Ausgabeoption “FreeFit” zwischen 200 nm und 800 nm in x und y bestimmt. Die Lokalisationsgenauigkeit beider Methoden wurde aus diesen Daten nach MORTENSEN errechnet [51].

Dabei wurde für die *d*STORM Daten des DNA-Origami Konstruktes mit 18 nm Farbstoffabstand eine Lokalisationsgenauigkeit in x und y von  $\sim 8,5$  nm  $\pm$  2,0 nm (SA) bzw.  $\sim 8,2$  nm  $\pm$  2,1 nm (SA) errechnet. Im Vergleich dazu wurde aus den Daten des 18 nm DNA-Origami Konstruktes der DNA-PAINT Messungen eine Lokalisationsgenauigkeit in x- und y-Richtung von  $\sim 3,3$  nm  $\pm$  1,0 nm (SA) bzw.  $\sim 3,4$  nm  $\pm$  0,9 nm (SA) errechnet.

Zur weiteren Analyse und einem genaueren Verständnis der photophysikalischen Vorgänge wurden die mit Cy5 Farbstoff modifizierten DNA-Origami Konstrukte, wie in Abschnitt 4.2.2, durch Aufnahmen von Intensitätstrajektoren an einem konfokalen Mikroskopaufbau, bei dem die Anregungsquelle mit Einzelphotonen-sensitiven Detektoren synchronisiert ist, genauer betrachtet. Hierzu wurde durch Abrastern eines Bereiches einer Einzelmoleküloberfläche der Cy5 gekoppelten DNA-Origami Strukturen diverser Abstände einzelne Fluoreszenzpunkte ausgewählt und in einer Fluoreszenzlebenszeitbestimmungskonfiguration die Intensitätsspur des jeweiligen DNA-Origami in Photoschaltpuffer für 5 Minuten gemessen. Des Weiteren wurden unter diesen Bedingungen Intensitätstrajektoren der jeweiligen DNA-Origami

Konstrukte aufgenommen, wobei hier die Detektoren synchronisiert wurden. Ein Überblick über die jeweiligen Messergebnisse ist in Abbildung 41 dargestellt und die Werte der jeweiligen Fluoreszenzlebenszeiten sind in Tabelle 7 aufgeführt.



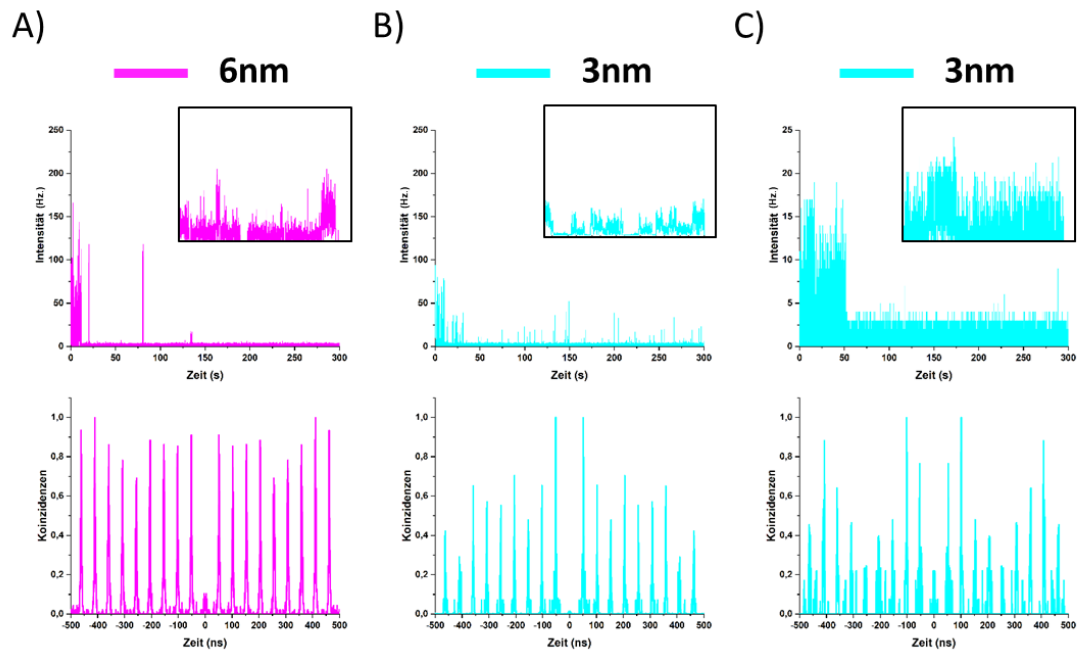
**Abbildung 41: Intensitätstrajektoren konfokaler Messungen, sowie die daraus berechneten Fluoreszenzlebenszeiten und Photonenkoinzidenzen.** Darstellung der konfokal gemessenen Intensitätstrajektoren (Klasseneinteilung: 1 ms) der 4-fach Cy5 markierten DNA-Origami Konstrukte mit Interfluorophordistanzen von 18 nm (rot), 9 nm (ockergelb), 6 nm (magenta) und 3 nm (cyan). In der oberen Reihe sind die Intensitätstrajektoren dargestellt (Intensitäten in Hz), die mittlere Reihe zeigt das jeweilige Photonenkoinzidenzhistogramm und die untere Reihe die jeweilige histogrammierte mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebenszeit, errechnet aus den Intensitätssignalen der jeweiligen Trajekturen. Das Histogramm der Fluoreszenzlebenszeiten wurde dabei aus 7 – 9 Trajekturen der jeweiligen DNA-Origami Konstrukte ermittelt. Die Messungen wurden in 100 mM MEA + 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) bei einer Laserpulsrepetitionsrate von 19,5 MHz und einer Anregungsleistung von  $\sim 2,5$  kW/cm<sup>2</sup> bei 640 nm für jeweils 5 Minuten durchgeführt.

**Tabelle 7: Fluoreszenzlebenszeit mehrfach markierter DNA-Origami Konstrukte unterschiedlicher Interfluorophordistanzen unter dSTORM-Bedingungen.** Die Fluoreszenzlebensdauern wurden aus 7 – 9 konfokal gemessenen Intensitätstrajektoren bestimmt. Alle Messungen wurden dabei in 100 mM MEA + 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) unter einer Anregungspulsrepetitionsrate von 19,5 MHz (51,3 ns) und einer Anregungsleistung von  $\sim 2,5$  kW/cm<sup>2</sup> bei 640 nm durchgeführt. Die Abklingkurven der Fluoreszenzlebenszeit wurden mit dem Verfahren der kleinsten Quadrate der Entfaltung bestimmt und die Qualität der Annäherung an die Abklingfunktion über die jeweilige reduzierte Residuenquadratsumme ( $\chi^2 = 0,9 - 1,1$ ) beurteilt. Die Lebenszeiten wurden über die gesamte Länge der Einzelaufnahmen (je 5 Minuten) bestimmt, dabei wurde Fluoreszenzlebenszeit des 18 nm DNA-Origami mit einem monoexponentiellen Funktion angepasst und die Fluoreszenzlebenszeiten des 9 nm, 6 nm und 3 nm DNA-Origami mit einer biexponentiellen Funktion angepasst, wobei die erste Fluoreszenzlebenszeitkomponente auf 1,74 ns festgesetzt wurde. Die Kennzeichen A<sub>n</sub> bzw.  $\tau_n$  beziehen sich auf die jeweiligen Parameter (Amplitude (A), Lebensdauer ( $\tau$ ) der entsprechenden Fluoreszenzlebenszeitkomponente der mono- (1) bzw. biexponentiellen (1 und 2) Anpassung.

| Probe | A1 / $\tau_1$ (ns)    | A2 / $\tau_2$ (ns)     | $\tau_{\emptyset, \text{Amplitude}}$ (ns) |
|-------|-----------------------|------------------------|---|
| 18 nm | 1,0 / 1,74 $\pm$ 0,01 |                        | 1,74 $\pm$ 0,01                           |
| 9 nm  | 0,22 / 1,74 $\pm$ --- | 0,78 / 1,70 $\pm$ 0,01 | 1,72 $\pm$ 0,01                           |
| 6 nm  | 0,72 / 1,74 $\pm$ --- | 0,28 / 0,83 $\pm$ 0,08 | 1,50 $\pm$ 0,07                           |
| 3 nm  | 0,50 / 1,74 $\pm$ --- | 0,50 / 0,44 $\pm$ 0,06 | 0,89 $\pm$ 0,37                           |

Dabei ist zu erkennen, dass die DNA-Origami Konstrukte mit einer Interfluorophordistanz von 18 nm, 9 nm und 6 nm über die gesamte Aufnahmezeit viele Blinkereignisse zeigen, die vergleichbar mit den *d*STORM Intensitätstrajektoren im Weitfeld in Abbildung 37 sind. Die Intensitäten sind dabei in den Aufnahmen ähnlich hoch bzw. vergleichbar. Starke Abweichungen von diesem Verhalten zeigen Aufnahmen des DNA-Origami Konstruktes mit einer Interfluorophordistanz von 3 nm. Hier ist, ähnlich zu Abbildung 37, ein starkes "Flackern" der Intensität zu Beginn der Messung zu erkennen. Nach diesem Verhalten zeigen sich nur noch vereinzelt Blinkereignisse. Die in Abbildung 41 gezeigten Trajektoren spiegeln dabei representative Auswahlen an zeitlichen Intensitätsverläufen bzw. Blinkcharakteristika der diversen 4-fach Cy5 modifizierten DNA-Origami Konstrukte, wobei das 6 nm DNA-Origami Konstrukt vereinzelt auch ein "Flacker"-Verhalten zu Beginn der Messung zeigte (Abb. 42). Die Photonenkoinzidenzen der DNA-Origami Aufnahmen zeigen für 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm mit  $\sim 0,04 \pm 0,02$ ,  $\sim 0,05 \pm 0,03$ ,  $\sim 0,11 \pm 0,05$  bzw.  $\sim 0,10 \pm 0,09$  stets niedrige Werte. Diese Werte wurden aus den Intensitätstrajektoren unter synchronisierter Detektorenkonfiguration errechnet. Die Fluoreszenzlebenszeit der Blinkspuren wurde unter der Konfiguration der Synchronisation der Anregungspulse mit den Detektoren aufgenommen und aus der gesamte Zeit der Aufnahme errechnet. Die Abklingkurve der Fluoreszenzlebenszeit des 18 nm DNA-Origami Konstruktes wurde mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst. Hierbei wurde eine Fluoreszenzlebenszeit dieses Konstruktes von  $\sim 1,74 \text{ ns} \pm 0,01 \text{ ns}$  bestimmt. Die DNA-Origami Konstrukte mit einer Interfluorophordistanz von 9 nm, 6 nm und 3 nm wurden mit einer biexponentiellen Funktion angepasst und der Wert der ersten Lebenszeitkomponente auf 1,74 ns (Lebenszeit 18 nm DNA-Origami) festgesetzt. Daraus ergaben sich Werte der zweiten Komponente von  $\sim 1,70 \text{ ns} \pm 0,01 \text{ ns}$  (9 nm DNA-Origami),  $\sim 0,83 \text{ ns} \pm 0,08 \text{ ns}$  (6 nm DNA-Origami) bzw.  $\sim 0,44 \text{ ns} \pm 0,06 \text{ ns}$  (3 nm DNA-Origami). Hierbei ist zu erkennen, dass mit verringertem Abstand zwischen den Fluorophoren die jeweilige Fluoreszenzlebenszeitkomponente stark absinkt. Diese Tendenz ist bei Betrachtung der amplitudengewichteten mittleren Lebenszeit ( $\tau_{\emptyset, \text{Amplitude}}$ ) von  $\sim 1,72 \pm 0,01$  (9 nm DNA-

Origami),  $\sim 1,50 \text{ ns} \pm 0,07 \text{ ns}$  (6 nm DNA-Origami) bzw.  $\sim 0,89 \text{ ns} \pm 0,37 \text{ ns}$  (3 nm DNA-Origami) ebenso zu erkennen, aber nicht so stark ausgeprägt. Um das Blinkverhalten der 3 nm DNA-Origami Strukturen zu Beginn der Messung weiter zu analysieren wurden weitere Messungen mit geringerer Anregungsleistung ( $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$ ) durchgeführt. In Abbildung 42 sind Intensitätsspurten der 3 nm DNA-Origami Konstrukte bei  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  und  $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$  im Vergleich dargestellt, sowie eine Intensitätstrajektion der 6 nm DNA-Origami Struktur, die vereinzelt auch ein "Flacker"-Verhalten zu Beginn der Messung bei  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  zeigte. Dabei ist zu sehen, dass die Intensitätstrajektion des 6 nm DNA-Origami Konstruktes die höchste Intensität besitzt. Des Weiteren ist zu erkennen, dass zu Beginn der Messung enorme Blinkereignisse zu sehen sind, die in ihrer Intensität schnell fluktuieren, nach  $\sim 10 \text{ s}$  kommt dieses schnelle Fluktuieren und Blinken zum Erliegen, gefolgt von wenigen einzelnen Blinkereignissen. Das 3 nm DNA-Origami Konstrukt, gemessen mit  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$ , zeigt eine geringere Intensität als das 6 nm DNA-Origami Konstrukt. Die schnellen Blinkereignisse der Emitter sind sehr ähnlich zur 6 nm DNA-Origami Struktur, aber die Intensität der Blinkereignisse fluktuiert stärker. Die Dauer dieses "Flackern" beträgt hier ebenso  $\sim 10 \text{ s}$  bevor mehrere vereinzelt Blinkereignisse geringerer Intensität folgen. Bei Messungen der 3 nm DNA-Origami Struktur mit geringer Anregungsleistung ( $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$ ) fällt auf, dass das Verhalten des "Flackern" verlängert ist und  $\sim 50 \text{ s}$  andauert. Bei näherer Betrachtung ist zu sehen, dass die Intensität sehr schnell zwischen 0 und 15 Hz fluktuiert und somit ein schnelles Blinkverhalten aufweist. Nach  $\sim 50 \text{ s}$  kommt hier dieses schnelle Blinkverhalten zum Erliegen und es folgen nur wenige vereinzelt Blinkereignisse bis zum Ende der Messung. Die 6 nm und 3 nm DNA-Origami Konstrukte, gemessen bei  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$ , zeigen hier mit  $\sim 0,114 \pm 0,004$  bzw.  $\sim 0,027 \pm 0,008$  einen geringen Wert der Photonenkoinzidenz. Dieser Wert ist beim 3 nm DNA-Konstrukte, gemessen bei  $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$ , dahingegen mit  $\sim 0,383 \pm 0,155$  etwas höher.

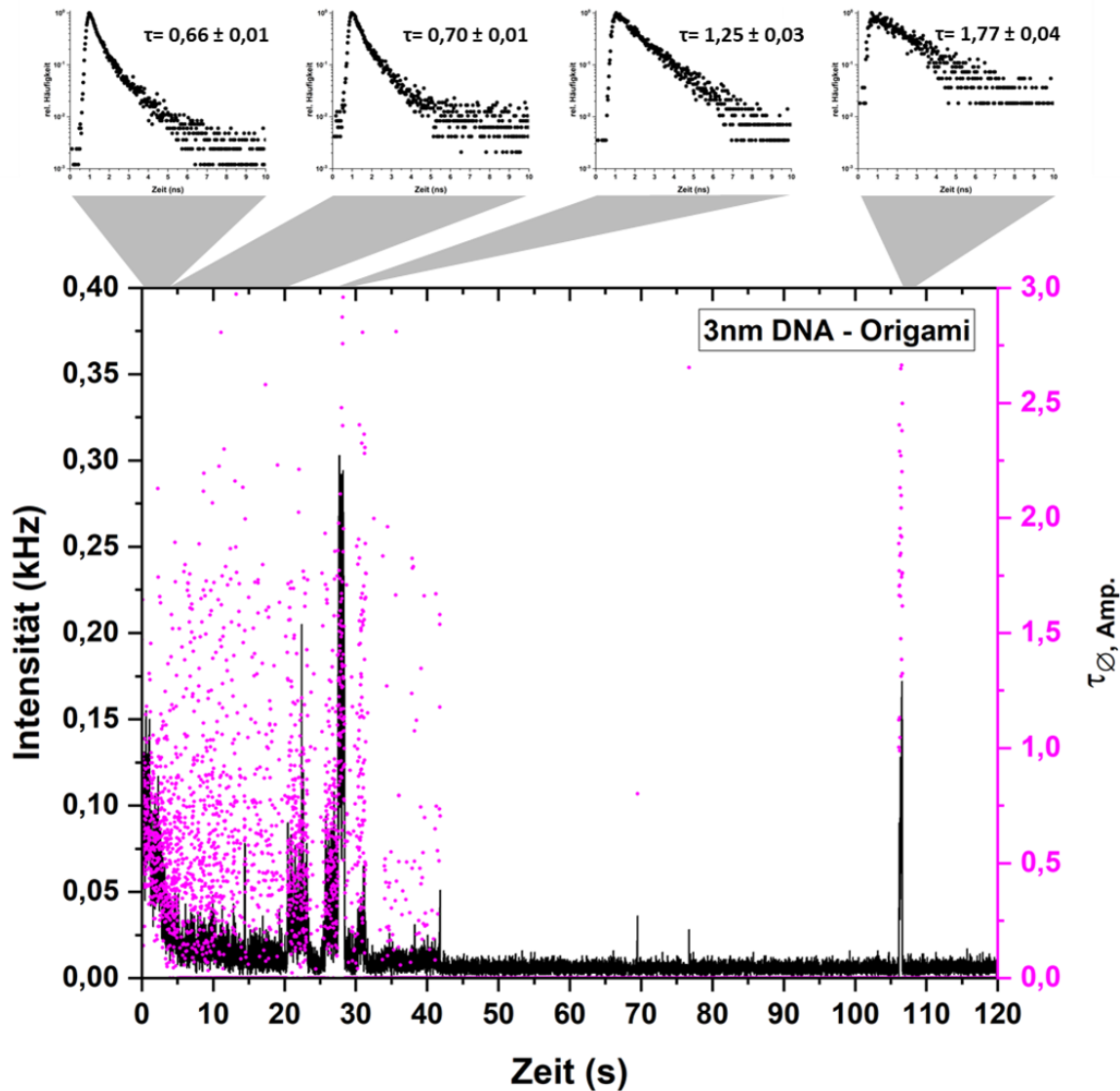


**Abbildung 42: Intensitätsflackern des 6 nm und 3 nm DNA-Origami unter diversen Anregungsleistungen.** A) Intensitätstrajektorie (oben) (Klasseneinteilung: 1 ms) des DNA-Origami Konstruktes mit 6 nm Interfluorophordistanz gemessen mit  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung bei 640 nm mit dazugehörigen Photonenkoinzidenzdiagramm (unten) ermittelt über die gesamte Messzeit. B) Intensitätsspur (oben) (Klassenbreite: 1 ms) des 3 nm DNA-Origami Konstruktes gemessen mit  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  bei 640 nm, sowie das entsprechende Photonenkoinzidenzdiagramm (unten) der gesamten Zeitspur. C) Intensitätsverlauf (oben) (Klassenbreite: 1 ms) des 3 nm DNA-Origami Konstruktes gemessen mit  $\sim 0,5 \text{ kW/cm}^2$  bei 640 nm und dem dazugehörigen Photonenkoinzidenzdiagramm (unten). Alle Messungen wurden mit einer Repetitionsrate von 19,5 MHz (51,3 ns) in 100 mM MEA + 50 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,4) durchgeführt. Alle Intensitäten sind in Hz angegeben. Die Einschübe in den oberen Abbildungen (A – C) zeigen jeweils die ersten 10 s des Intensitätstrajektorie.

Zur Weiteren Analyse des schnellen Blinkverhaltens der 3 nm DNA-Origami Strukturen zu Beginn der Messungen in Photoschaltpuffer wurden die Intensitätstrajektorien, gemessen bei  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$ , im Hinblick auf die Fluoreszenzlebenszeitveränderung über die Zeit betrachtet. Dies ist in Abbildung 43 beispielhaft dargestellt. Dabei zeigt sich der bei den 3 nm DNA-Origami Strukturen überwiegend auftretende Intensitätsverläufe mit einem starken “Flackern” der Emission zu Beginn der Messung. Mit einer biexponentiellen Funktion wurden die Abklingkurven der Fluoreszenzlebenszeit zu verschiedenen Zeitbereichen der Messung bestimmt. So zeigt sich, dass zu Beginn der Messung (0 – 4 s) die durchschnittliche amplitudengewichtete Fluoreszenzlebenszeit des 3 nm DNA-Origami Konstruktes mit  $\sim 0,66 \text{ ns} \pm 0,01 \text{ ns}$  niedrig ist. Diese steigt im Verlauf der Messung mit  $\sim 0,70 \text{ ns} \pm 0,01 \text{ ns}$  ( $\sim 4 - 20 \text{ s}$ ),  $\sim 1,25 \text{ ns} \pm 0,03 \text{ ns}$  ( $\sim 27 - 28 \text{ s}$ ) und schließlich auf  $\sim 1,77 \text{ ns} \pm 0,04 \text{ ns}$  ( $\sim 106 - 107 \text{ s}$ ) an. Dabei zeigt sich während des schnellen Blinkverhalten bzw. “Flackern”, das hier bis  $\sim 40 \text{ s}$  anhält, eine über den Zeitverlauf leicht ansteigende Fluoreszenzlebenszeit, während ein



einzelnes Blinkereignis, nach Beendigung dieses “Flacker” – Verhaltens, eher eine Fluoreszenzlebenszeit vergleichbar mit der Fluoreszenzlebenszeit des 18 nm DNA-Origami Konstruktes besitzt. Diese relativ hohe Fluoreszenzlebenszeit wird während des schnellen Blinkverhaltens zu Beginn der Messung nur selten erreicht.

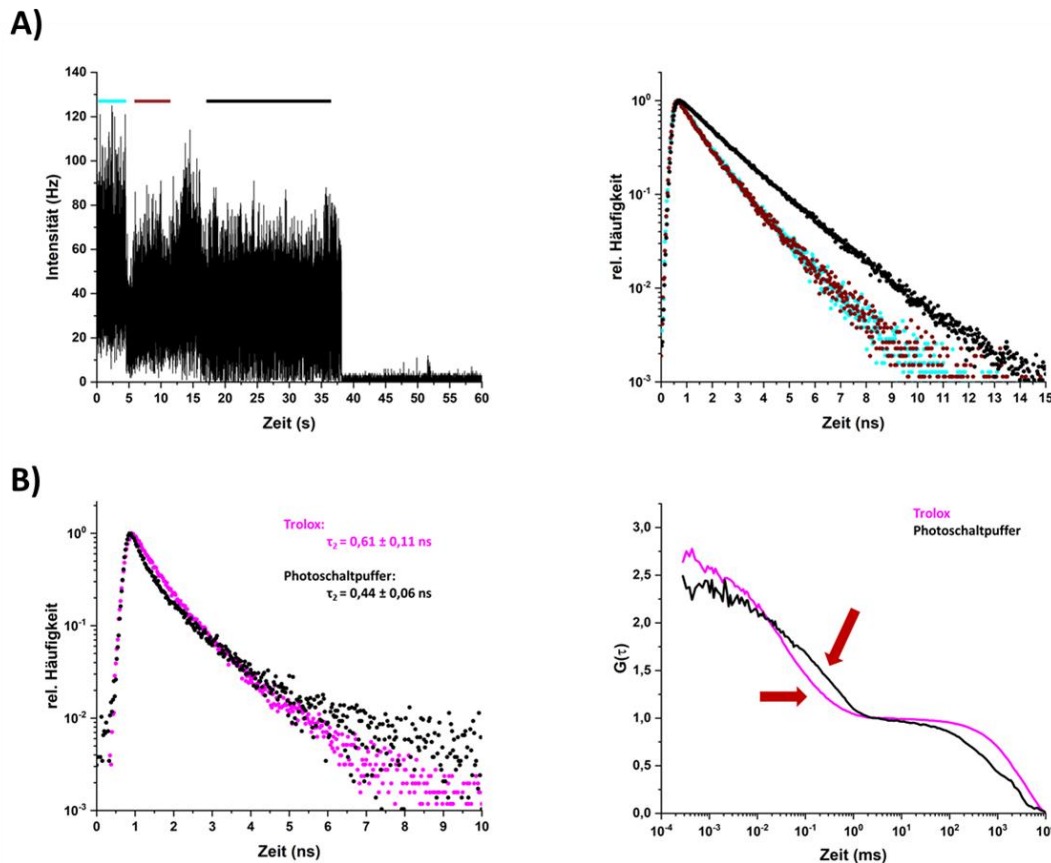


**Abbildung 43: Zeitliches Fluoreszenzlebenszeitverhalten des 3 nm DNA-Origami Konstruktes.** Intensitätstrajektion (schwarze Linie, Klasseneinteilung: 1 ms) des DNA-Origami Konstrukt mit 3 nm Interfluorophordistanz gemessen mit  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung bei 640 nm, sowie die entsprechende zeitliche Veränderung der mittleren amplitudengewichteten Fluoreszenzlebenszeit (Punkte magenta, in ns). Alle Messungen wurden mit einer Repetitionsrate von 19,5 MHz (51,3 ns) in 100 mM MEA + 50 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,4) durchgeführt. Die entsprechende Abklingkurve zu den Zeitbereichen  $\sim 0 - 4 \text{ s}$ ,  $\sim 4 - 20 \text{ s}$ ,  $\sim 27 - 28 \text{ s}$  und  $\sim 106 - 107 \text{ s}$  sind im oberen Bereich der Abbildung zusammen mit der jeweiligen angepassten mittleren amplitudengewichteten Fluoreszenzlebenszeit angegeben.

Vergleichsmessungen des 3 nm DNA-Origami Konstruktes unter photostabilisierenden Pufferbedingungen eines Trolox/Troloxquinon-Systems zeigten ein ähnliches “Flacker”-Verhalten bzw. Blinkverhalten wie unter thiolhaltigen Pufferbedingungen (Abb. 44 A). Dabei

---

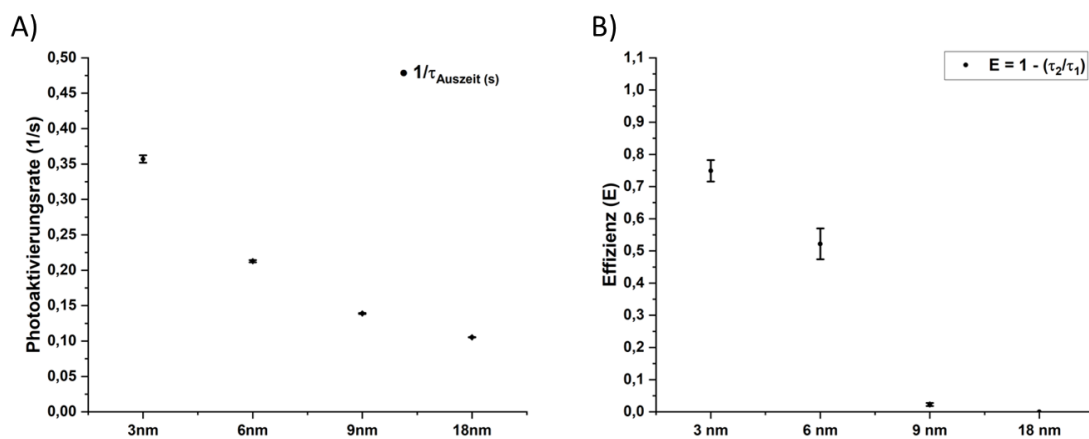
wurde ebenso die Lebenszeit dieser starken Intensitätsfluktuationen über entsprechende Zeiträume analysiert und mit einer biexponentiellen Anpassung bestimmt, wobei die erste Lebenszeitkomponente stets  $\sim 1,6 \text{ ns} - 1,8 \text{ ns}$  betrug (Abb. 44 A). Zu Beginn ( $\sim 0 \text{ s} - 5 \text{ s}$ ) zeigte sich eine verringerte zweite Lebenszeitkomponente von  $\sim 0,68 \text{ ns} \pm 0,09 \text{ ns}$  (Abb. 44 A). Im weiteren Verlauf der Messung ( $\sim 5 \text{ s} - 10 \text{ s}$ ) stieg diese Lebenszeitkomponente mit  $\sim 0,83 \text{ ns} \pm 0,02 \text{ ns}$  etwas an (Abb. 44 A). Als das Intensitätsniveau nahezu auf einem konstanten Niveau bis zum Ende der Messung verblieb ( $\sim 15 \text{ s} - 38 \text{ s}$ ) erreichte diese Komponente der Lebenszeit mit  $\sim 1,24 \text{ ns} \pm 0,05 \text{ ns}$  ähnliche Werte wie die erste Komponente (Abb. 44 A). Im Vergleich zu Messungen unter Photoschaltbedingungen ist zu erkennen, dass die zweite Lebenszeitkomponente dort niedriger ist als unter thiofreien Bedingungen (Abb. 44 B). Da das Signal der Intensitätstrajektoren unter den beiden Bedingungen von zwei Photodetektoren eingesammelt wurde, konnten diese Trajektoren jeweils korreliert werden (Abb. 44B). Dabei zeigte sich, dass unter *d*STORM-Bedingungen eine weitere Amplitude im oberen  $\mu\text{s}$ -Bereich hinzukommt, die unter Trolox/Troloxquinon-Bedingungen nicht zu erkennen ist (Abb. 44B).



**Abbildung 44: Zeitlicher Intensitäts- und Fluoreszenzlebenszeitverlauf des 3 nm DNA-Origami unter Thiol- und Trolox-Bedingungen.** A) Intensitätstrajektorie (links, Klasseneinteilung: 1 ms) des 3 nm DNA-Origami Konstruktes gemessen mit  $\sim 2,5$  kW/cm<sup>2</sup> Anregungsleistung bei 640 nm, sowie die entsprechende zeitliche Veränderung (cyan:  $\sim 0$  s – 5 s, dunkelrot:  $\sim 5$  s – 10 s, schwarz:  $\sim 15$  s – 38 s) der Fluoreszenzlebenszeit (rechts) in ns. B) Fluoreszenzlebenszeit (links) des 3 nm DNA-Origami Konstruktes über die gesamte Aufnahmezeit unter troloxhaltigen (60 s, magenta) und thiolhaltigen (300 s, schwarz) Bedingungen, sowie die korrelierten Trajektoren (rechts), jeweils gemittelt aus 7 – 9 Einzelmessungen. Die roten Pfeile des korrelierten Intensitätstrajektoren unter Thiol-Bedingungen zeigt die, im Vergleich zur Messung unter Trolox-Bedingungen, neu auftretende Amplitude. Alle Messungen wurden mit einer Repetitionsrate von 19,5 MHz (51,3 ns) durchgeführt. Die entsprechenden Abklingkurven wurden mit einem biexponentiellen Funktion angepasst, wobei  $\tau_1$  auf 1,74 ns festgehalten wurde.

Aus den von den *d*STORM-Aufnahmen im Weitfeld bestimmten Werten der Auszeiten der Cy5 markierten DNA-Origami Strukturen unterschiedlicher Fluorophorabstände wurde für die jeweiligen Konstrukte die Photoaktivierungsrate bestimmt. Diese wurde aus dem reziproken Wert der jeweiligen bestimmten Auszeit errechnet. Des Weiteren wurden aus den Lebenszeitkomponenten der unter konfokalen Bedingungen gemessenen Intensitätstrajektoren eine Energieübertragungseffizienz ( $E$ ) bestimmt. Diese wurde aus dem Quotienten der kurzen Lebenszeitkomponente ( $\tau_2$ ) und der langen Lebenszeitkomponente ( $\tau_1$ ) der biexponentiellen Anpassung der Abklingkurven der jeweiligen DNA-Origami Konstrukte gemäß Gleichung 8 berechnet (Tab. 7). Die errechneten Werte der Photoaktivierungsraten

und der Energieübertragungseffizienzen sind in Abbildung 45 dargestellt. Die Photoaktivierungsrate steigt bei Verringerung des Fluorophorabstandes an. So ergaben sich Werte von  $\sim 0,1050 \text{ s}^{-1} \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  (18 nm DNA-Origami),  $\sim 0,1390 \text{ s}^{-1} \pm 0,0010 \text{ s}^{-1}$  (9 nm DNA-Origami),  $\sim 0,2130 \text{ s}^{-1} \pm 0,0015 \text{ s}^{-1}$  (6 nm DNA-Origami) und  $\sim 0,3570 \text{ s}^{-1} \pm 0,0053 \text{ s}^{-1}$  (3 nm DNA-Origami). Die höchste Photoaktivierungsrate wurde damit bei einer Interfluorophordistanz von 3 nm errechnet. Die Energieübertragungseffizienzen ( $E$ ) zeigten einen ähnlichen Verlauf. Hier wurden Werte von  $\sim 0,023 \pm 0,005$  (9 nm DNA-Origami),  $\sim 0,529 \pm 0,048$  (6 nm DNA-Origami) und  $\sim 0,749 \pm 0,033$  (3 nm DNA-Origami). Die höchste Energieübertragungseffizienz wurde hier ebenso bei der geringsten Interfluorophordistanz von 3 nm errechnet. Für das DNA-Origami mit einem Abstand von 18 nm zwischen den Fluorophoren wurde kein Energieübertragungseffizienzwert errechnet, da hier die Abklingkurve mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst wurde (Tab. 7).

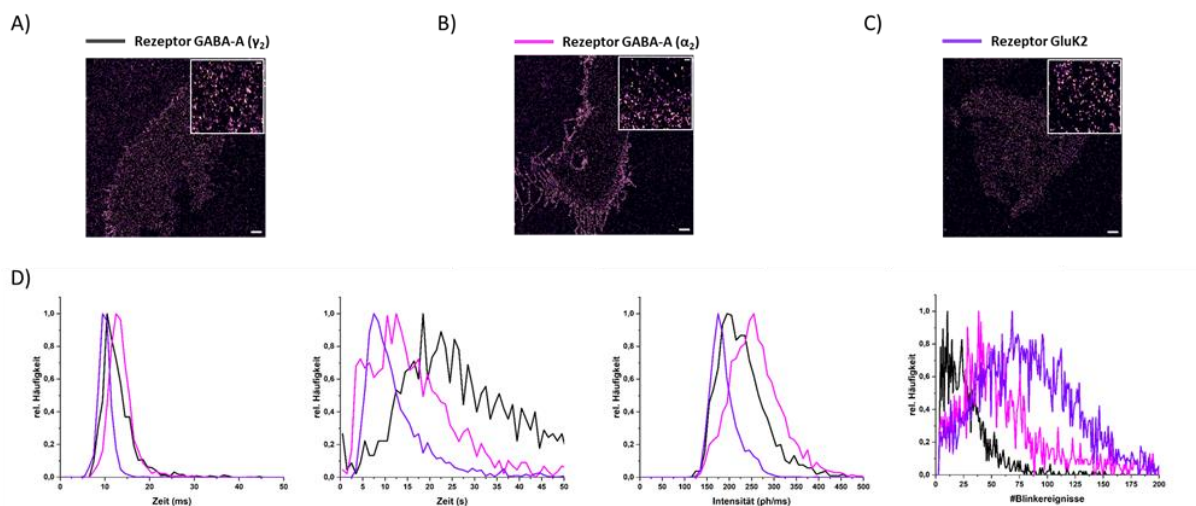


**Abbildung 45: Photoaktivierungsraten und Energieübertragungseffizienzen der verschiedenen Interfluorophordistanzen.** A) Photoaktivierungsrate der DNA-Origami Konstrukte mit 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm Interfluorophordistanz gemessen mit  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  Anregungsleistung bei 641 nm in 100 mM MEA + 50 mM  $\text{MgCl}_2$  im Weitfeld mit einer Integrationszeit von 5 ms. B) Effizienzen der Energieübertragung errechnet aus der Fluoreszenzlebenszeiten der konfokalen Intensitätstrajektoren der DNA-Origami Konstrukte mit 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm Interfluorophordistanz gemessen in 100 mM MEA + 50 mM  $\text{MgCl}_2$  unter einer 640 nm Anregungsleistung von  $\sim 2,5 \text{ kW/cm}^2$  bei einer Repetitionsrate von 19,5 MHz (51,3 ns). Alle Werte sind Mittelwerte aus jeweils 3 – 5 Einzelmessungen.

### 4.3.3 Photophysikalische Rezeptoranalysen

Anhand der zuvor dargelegten Ergebnisse der DNA-Origami Strukturen diverser Interfluorophordistanzen, wurden biologische Proben angefertigt und mit Cy5-Farbstoff markiert. Hierbei wurden von Alexander Kuhlemann Lebendzellpräparationen der Rezeptoren GABA-A- $\gamma_2$ , GABA-A- $\alpha_2$  und GluK2 durchgeführt und die jeweiligen Abstände der Modifikationsstellen im Protein berechnet. Der Rezeptor GABA-A- $\gamma_2$  wurde so modifiziert,

dass er über unnatürliche Aminosäuren (engl.: unnatural amino acids, uAA) eine Klick-Chemie reaktive Seitengruppe trägt (TCO). Der Rezeptor GABA-A- $\alpha_2$  wurde auf die gleiche Weise modifiziert, sodass dieser Rezeptor zwei TCO-Gruppen im Abstand von  $\sim 5$  nm trägt. Durch Einführung einer uAA in jedes Monomer des GluK2 Rezeptors zeigt dieser vier TCO-Modifikationen im Vollängenrezeptor. Alle TCO-modifizierten Rezeptoren wurden am Tag der Messung mit H-Tet-Cy5 geklickt und unter *d*STORM-Bedingungen im Weitfeld vermessen. Diese Messungen wurden anschließend identisch zu den DNA-Origami Strukturen ausgewertet, wobei hier der Beobachtungsradius kleiner gewählt wurde, um Emittter zeitlich zu verfolgen. Die Ergebnisse dieser Rezeptormessungen sind in Abbildung 46 und Tabelle 8 dargestellt.



**Abbildung 46: Zeitliche Fluoreszenzanalyse der Weitfeld *d*STORM-Rezeptoraufnahmen.** Darstellung der rekonstruierten Aufnahmen der Rezeptoren A) GABA-A( $\gamma_2$ ), B) GABA-A( $\alpha_2$ ) und C) GluK2, sowie D) der relativen Häufigkeit der Fluoreszenzzeit (links, Klassenbreite: 1 ms), der Zeit im nicht-fluoreszierendem Zustand (zweites von links, Klassenbreite: 1 s), der Emissionsintensität (zweites von rechts, Klassenbreite: 10 Photonen/ms) und der Blinkhäufigkeit (rechts, Klassenbreite: 1 Ereignis) der Emittter der Cy5 markierten Rezeptoren GABA-A- $\gamma_2$  (schwarz), GABA-A- $\alpha_2$  (magenta) und GluK2 (violett). Die Aufnahmen wurden in 100 mM MEA (pH 7,4) bei 641 nm mit einer Anregungsleistung von  $\sim 2,5$  kW/cm<sup>2</sup> und einer Integrationszeit von 5 ms für 20 Minuten im TIRF-Beleuchtungsmodus durchgeführt. Die Histogramme zeigen die summierten Daten aus 3 – 5 Einzelaufnahmen und wurden jeweils auf die Anzahl der analysierten Emittter und auf den jeweiligen maximalen Wert normiert. Die Maßstabsleiste der Ausschnitte ganzer rekonstruierter Zellen zeigt 1  $\mu$ m, die Maßstabsleiste vergrößerter zellulärer Bereiche (Einschub) zeigt 100 nm.

**Tabelle 8: Zeitliche Analyse der Emittterfluoreszenzsignale einfach und mehrfach markierter Rezeptoren.** Alle Analysen wurden mit einem Beobachtungsradiusparameter von  $\sim 25$  nm durchgeführt und in Bezug auf die jeweilige Fluoreszenzintensität der detektierten Emittter ( $I_{AN}$ ) in Photonen/ms, der jeweiligen Detektionszeit des Signals ( $\tau_{AN}$ ) in ms, der Auszeit zwischen den jeweiligen Lokalisationsereignissen der Emittter im Beobachtungsradius ( $\tau_{AUS}$ ) in Sekunden (s) und die jeweiligen Blinkereignisse der Emittter im Beobachtungsradius ausgewertet. Die jeweiligen Messungen wurden bei einer Integrationszeit von 5 ms (200 Hz) für jeweils 20 Minuten mit einer Anregungsleistung von  $\sim 2,5$  kW/cm<sup>2</sup> bei 641 nm in 100 mM MEA (pH 7,4). Die jeweiligen analysierten Daten wurden dabei histogrammiert (Abb. 46) und die jeweiligen durchschnittlichen Parameter mit ihrer Standardabweichung (SA) aufgelistet.

| Rezeptor              | $\tau_{AN}$ (ms) |        | $\tau_{AUS}$ (s) |        | $I_{AN}$ (Photonen/ms) |        | Blinkereignisse |        |
|-----------------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------------|--------|-----------------|--------|
|                       | Mittelwert       | Median | Mittelwert       | Median | Mittelwert             | Median | Mittelwert      | Median |
| GABA-A ( $\gamma_2$ ) | 13,0 ± 3,9       | 12,4   | 34,4 ± 22,2      | 29,2   | 225,8 ± 46,3           | 218,3  | 29,2 ± 22,8     | 24     |
| GABA-A ( $\alpha_2$ ) | 13,1 ± 2,6       | 12,9   | 19,5 ± 15,9      | 16,0   | 263,9 ± 64,5           | 256,8  | 69,0 ± 60,5     | 50     |
| GluK2                 | 10,0 ± 1,5       | 9,9    | 13,6 ± 12,1      | 10,4   | 189,9 ± 31,9           | 182,6  | 83,9 ± 43,8     | 80     |

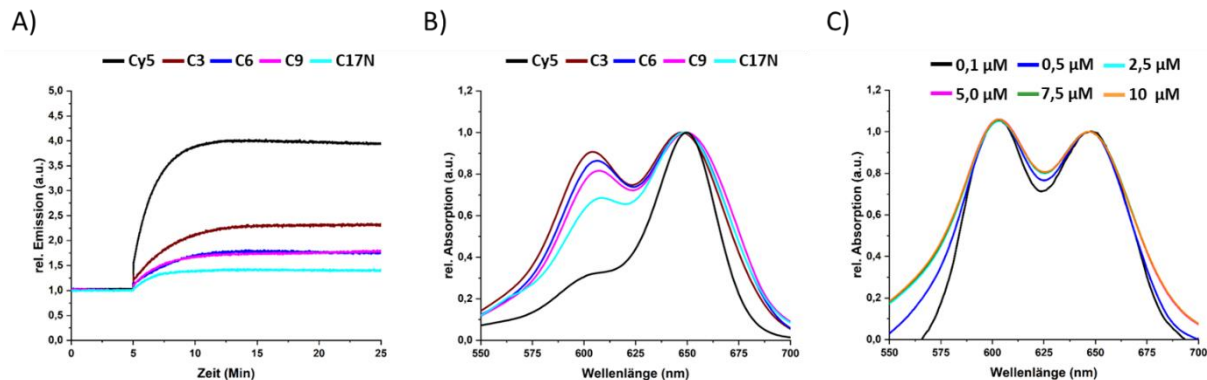
Dabei ergaben sich mit  $\sim 13,0 \text{ ms} \pm 3,9 \text{ ms}$  (SA) (Median:  $\sim 12,4$ ) und  $\sim 13,1 \text{ ms} \pm 2,6 \text{ ms}$  (SA) (Median:  $\sim 12,9$ ) für GABA-A- $\gamma_2$  und GABA-A- $\alpha_2$  relativ ähnliche Werte der Fluoreszenzzeiten, lediglich der 4-fach mit Cy5 markierte Rezeptor GluK2 zeigte eine leicht niedrigere Fluoreszenzzeit von  $\sim 10,0 \text{ ms} \pm 1,5 \text{ ms}$  (SA) (Median:  $\sim 9,9$ ). Auch die Fluoreszenzintensität ist für alle Rezeptordaten relativ ähnlich. Diese zeigt für GABA-A- $\alpha_2$  mit  $\sim 263,9 \text{ Ph/ms} \pm 64,5$  (Ph/ms) (SA) (Median:  $\sim 256,8 \text{ Ph/ms}$ ) den höchsten Wert und für GluK2 mit  $\sim 189,9 \text{ Ph/ms} \pm 31,9$  (Ph/ms) (SA) (Median:  $\sim 182,6 \text{ Ph/ms}$ ) den niedrigsten Wert. Die Fluoreszenzintensität des einfach markierten GABA-A- $\gamma_2$  liegt mit  $\sim 225,8 \text{ Ph/ms} \pm 46,3$  (Ph/ms) (SA) (Median:  $\sim 218,3 \text{ Ph/ms}$ ) zwischen diesen Werten. Die Zeit zwischen den Fluoreszenzereignissen der Emitter im Beobachtungsradius unterscheidet sich hier stark. Diese Zeit ist mit  $\sim 34,4 \text{ s} \pm 22,2$  s (SA) (Median:  $\sim 29,2$ ) beim einfach markierten GABA-A- $\gamma_2$  am höchsten. Im Vergleich dazu sinkt beim doppelt markierten Rezeptor GABA-A- $\alpha_2$  diese Zeit um das  $\sim 1,8$ -fache auf  $\sim 19,5 \text{ s} \pm 15,9$  s (SA) (Median:  $\sim 16,0$  s). Für den 4-fach markierten Rezeptor GluK2 sinkt diese Zeit im Vergleich zum einfach markierten Rezeptor um das  $\sim 2,8$ -fache auf  $\sim 13,6 \text{ s} \pm 12,1$  s (SA) (Median:  $\sim 10,4$  s) und liegt hier am niedrigsten. In umgedrehter Reihenfolge dazu verhält es sich mit den Blinkereignissen der lokalisierten Emitter im Beobachtungsradius. Dort liegt die Anzahl der Ereignisse bei GABA-A- $\gamma_2$  mit  $\sim 29,2 \pm 22,8$  (SA) (Median:  $\sim 24$ ) am niedrigsten, steigt bei GABA-A- $\alpha_2$  mit  $\sim 69,0 \pm 60,5$  (SA) (Median:  $\sim 50$ ) um das  $\sim 2,1$ -fache und bei den Rezeptordaten zu GluK2 um das  $\sim 3,3$ -fache auf  $\sim 83,9 \pm 43,8$  (SA) (Median:  $\sim 80$ ) an.

#### 4.4 Spektroskopische Analysen von Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen

Die analysierten Dendronstrukturen wurden am Lehrstuhl für organische und biologische Chemie der organischen Chemie der Julius-Maximilians Universität Würzburg von Dr. Natalia Wolf und Louise Kersting unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Seibel synthetisiert. Diese Strukturen wurden terminal mit Cyaninfarbstoffen, analog zu Al647 bzw. Cy5, gekoppelt und

tragen im aktiven Zentrum eine Tetrazin, das für weitere Analysen via Klick – Chemie an eine Zielstruktur gekoppelt werden kann. Dabei besitzen die verwendeten Dendronstrukturen einen Interfluorophorabstand von  $\sim 0,8$  nm -  $\sim 1,5$  nm (C3),  $\sim 1,9$  nm –  $\sim 2,8$  nm (C6),  $\sim 2,3$  nm –  $\sim 3,6$  nm (C9) und  $\sim 3,4$  nm -  $\sim 4,9$  nm (C17N) (Abb. 12). Die Interfluorophorabstände wurden mithilfe der chemischen Darstellungssoftware Chem3D 17.0 ermittelt. Zur spektroskopischen Analyse der freien ungebundenen Dendronstrukturen wurden diese zuerst mittels TCO\*-Lysin (SiChem, SC-8008) abreagiert. Hierbei wurde ein 25-facher Überschuss an TCO\*-Lysin in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet und die zeitliche Emissionsänderung über 20 Minuten betrachtet. Die resultierenden zeitlichen Emissionsverläufe sind in Abbildung 47 A dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass ein freier Methyl-Tetrazin-Cy5 (Me-Tet-Cy5) Farbstoff nach Zugabe von TCO einen rapiden Anstieg der Emissionsintensität zeigt. Hierbei steigt die Emission, im Vergleich zur Emissionsintensität vor Zugabe von TCO, um das  $\sim 4$ -fache an. Die Dendronstrukturen C3, C6, C9 und C17N zeigen ebenso einen leichten Anstieg der Emissionsintensität nach Zugabe von TCO. Hierbei zeigte die Dendronstruktur C3 mit einem  $\sim 2,5$ -fachen Anstieg der Emissionsintensität die höchste Veränderung der Signalstärke nach Zugabe von TCO. Die Strukturen C6 und C9 zeigten einen vergleichbaren Anstieg von  $\sim 1,6$  und C17N einen leichten Anstieg von  $\sim 1,3$ . Daraufhin wurde das Absorptionsverhalten abreagierter Dendronstrukturen in PBS analysiert. Dies ist in Abbildung 47 B dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Dendronstrukturen, im Vergleich zum freien Me-Tet-Cy5 Farbstoff, ein breites Spektrum um das Absorptionsmaximum bei  $\sim 650$  nm aufweisen, sowie eine weitere starke Absorption (H-Dimer) bei  $\sim 600$  nm. Hierbei weist die Dendronstruktur C3 das höchste Absorptionsverhalten bei  $\sim 600$  nm auf. Dieses Absorptionsverhalten um  $\sim 600$  nm nimmt für die Dendronstrukturen C6 und C9 leicht ab und ist für die Struktur C17N am niedrigsten, aber dennoch ausgeprägt. Die Konzentrationsabhängigkeit dieser H-Dimerschulter bei  $\sim 600$  nm wurde für die Dendronstruktur analysiert, deren Absorptionsverhalten dort am höchsten ausgeprägt war. Die Messungen wurden hierbei in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Dabei zeigte sich mit ansteigender Konzentration der Dendronstruktur keine Veränderung der Höhe der H-Dimerschulter. Dies ist in Abbildung 47 C dargestellt.

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass in reinem Wasser, im Vergleich zu Messungen in PBS (Abb. 47 B), die H-Dimerabsorption höher ist (Abb. 47 C).



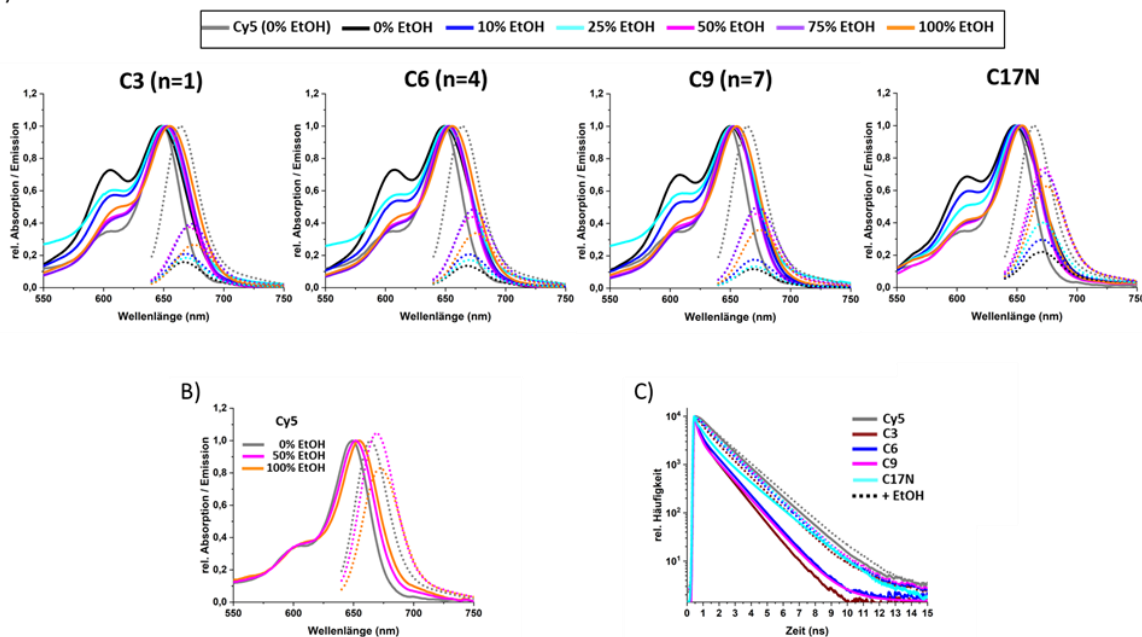
**Abbildung 47: Absorptions- und Emissionsverhalten abreagerter Dendronstrukturen in PBS und ddH<sub>2</sub>O.** A) Zeitlicher Verlauf der Emissionsintensität des freien Me-Tet-Cy5 (schwarz) und der Tet-Dendronstrukturen C3 (braun), C6 (blau), C9 (magenta) und C17N (cyan) mit einer Konzentration von jeweils ~ 1 µM in ddH<sub>2</sub>O. Nach 5 Minuten Messzeit wurde ein 25-facher Überschuss an TCO\*-Lysin zur jeweiligen Probe gegeben. Die Emissionsintensitäten wurden auf die jeweiligen Signalstärken vor Zugabe von TCO\*-Lysin normiert. B) Relatives Absorptionsverhalten einer 1 µM Lösung des freien abreagierten Cy5 (schwarz) und der abreagierten Dendronstrukturen C3 (braun), C6 (blau), C9 (magenta) und C17N (cyan) in PBS. Die Spektren wurden auf das jeweilige Absorptionsmaximum normiert. C) Messung des Absorptionsverhaltens der abreagierten Dendronstruktur C3 in ddH<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 0,1 µM (schwarz), 0,5 µM (blau), 2,5 µM (cyan), 5,0 µM (magenta), 7,5 µM (grün) und 10 µM (orange). Die jeweiligen Spektren wurden auf den Absorptionswert bei ~ 650 nm normiert.

Zur Analyse der Beeinflussung der H-Dimerbildung abreagerter Dendronstrukturen wurden spektroskopische Messungen mit steigender Ethanolkonzentration (EtOH) durchgeführt. In Abbildung 48 und Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser spektroskopischen Analysen dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass alle Dendronstrukturen ohne EtOH eine starke H-Dimerschulter zeigen und diesbezüglich auch eine stark unterdrückte Emission (Abb. 48 A). Im Vergleich der Emissionsintensitäten der Dendronstrukturen, bietet hier der größte Interfluorophorabstand des Dendrons C17N die höchste Fluoreszenzintensität (Abb. 48 A). Diese ist im Vergleich zu einem freien Cy5 Farbstoffes aber dennoch stark unterdrückt und liegt nur bei ~ 20 % (Abb. 48 A). Durch Zugabe von Ethanol (EtOH) steigt die Emission der Dendronstrukturen an (Abb. 48 A). Dabei erreicht die Emission bei 50 % EtOH ihr Maximum beim Dendronkonstrukt C17N und bei 75 % EtOH ist die höchste Emissionsintensität der restlichen Dendronstrukturen erreicht (Abb. 48 A). Hier wird, im Vergleich zum freien Cy5 Farbstoff ohne EtOH, für die Dendronstrukturen C3, C6 und C9 eine maximale Emissionsintensität von ~ 40 %, ~ 50 % und ~ 51 % erreicht, wohingegen das Dendronkonstrukt C17N eine Emissionsintensität von ~ 74 % erreicht (Abb. 48 A). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Emissionsintensität der Referenz,



im Vergleich zu Messungen in ddH<sub>2</sub>O, bei 50 % EtOH um ~ 5 % ansteigt und bei Messungen in 100 % EtOH mit ~ 82 % am geringsten ist (Abb. 48 B).

A)



**Abbildung 48: Spektroskopische Ensemblemessungen der Dendronstrukturen unter EtOH.** A) Ensemble-Absorptions- und Emissionsmessungen (durchgezogene Linien bzw. gepunktete Linien) der in Abbildung 12 dargestellten Dendronstrukturen C3, C6, C9 und C17N, sowie des freien Cy5 Farbstoffes als Referenz. Die Konzentrationen wurden jeweils auf ~ 1  $\mu$ M eingestellt. Die Messungen der Dendronstrukturen wurden dabei in H<sub>2</sub>O (schwarz), 10 % Ethanol (EtOH) (blau), 25 % EtOH (cyan), 50 % EtOH (magenta), 75 % EtOH (lila) und 100 % EtOH (orange) durchgeführt. Die jeweiligen Absorptionsspektren wurden auf ihren maximalen Wert normiert. Die jeweiligen Emissionsspektren wurden dabei auf ihre jeweilige Konzentration (OD-Wert der Absorption) und auf die Emissionsintensität der Referenz (freier Cy5) normiert. B) Absorptions- und Emissionsmessung (durchgezogene Linien bzw. gepunktete Linien) einer 1  $\mu$ M Referenzlösung in H<sub>2</sub>O (grau), 25 % EtOH (cyan) und 100 % EtOH (orange). Die Absorptionsspektren wurden auf ihren jeweiligen maximalen Wert normiert. Die jeweiligen Emissionsspektren wurden auf ihren maximalen Absorptionswert und der Emissionsintensität ohne Ethanolzusätze normiert. C) Ensemble Fluoreszenzlebensdauer messung des Referenzfarbstoffes (grau) und der Dendronstrukturen C3 (braun), C6 (blau), C9 (magenta) und C17N (cyan) zu einer Konzentration von ~ 1  $\mu$ M. Dabei wurde die Fluoreszenzlebenszeit in H<sub>2</sub>O (durchgezogene Linien), sowie in der EtOH-Konzentration (gepunktete Linien) der höchsten Emissionsintensitäten von A) gemessen. Alle Lebenszeitanpassungen wurden mit einer multiexponentiellen Funktion durchgeführt. Alle Dendronstrukturen und Cy5-Referenzfarbstoffe wurden zuvor mithilfe eines 25-fachen Überschusses an TCO-Molekülen abreagiert.

**Tabelle 9: Fluoreszenzlebensdauerwerte der Messungen der Dendronstrukturen aus Abb. 48 C).** Alle Farbstoffmoleküle wurden dabei zuvor mit einem 25-fachen Überschuss an TCO\*-Lysin Molekülen abreagiert. Des Weiteren wurde ein Me-Tet-Cy5 Farbstoff genutzt um die Kopplung vergleichbar zu machen und mögliche Effekte auszuschließen. Alle Messungen unter EtOH – Zugabe wurden dabei zu einer Konzentration gemessen, bei der die Emissionswerte aus Abb. 48 A) am höchsten waren. Die jeweiligen gemessenen Abklingkurven der Fluoreszenzlebensdauer wurden dabei mit multiexponentiellen Funktionen angepasst und die Qualität der Annäherung an die Abklingfunktion über die jeweilige reduzierte Residuenquadratsumme ( $\chi^2 = 0,9 - 1,1$ ) beurteilt. Die Kennzeichen  $A_n$  bzw.  $\tau_n$  beziehen sich auf die jeweiligen Parameter (Amplitude (A), Lebensdauer ( $\tau$ ) der entsprechenden Fluoreszenzlebenszeitkomponente der mono- (1) bzw. biexponentiellen (1 und 2) Anpassung. Die mittlere amplituden-gewichtete (A) Fluoreszenzlebenszeit ist dabei mit  $\tau_{\emptyset, Amp}$  angegeben.

| Probe | A1 / $\tau_1$ (ns)     | A2 / $\tau_2$ (ns)     | A3 / $\tau_3$ (ns) | $\tau_{\emptyset, Amplitude}$ (ns) |
|-------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Cy5   | 0,72 / 1,46 $\pm$ 0,01 | 0,28 / 0,86 $\pm$ 0,02 |                    | 1,29                               |

|             |                    |                    |                      |      |
|-------------|--------------------|--------------------|----------------------|------|
| Cy5 + EtOH  | 0,68 / 1,49 ± 0,01 | 0,32 / 0,07 ± 0,01 |                      | 1,04 |
| C3          | 0,10 / 1,20 ± 0,01 | 0,21 / 0,37 ± 0,01 | 0,69 / 0,040 ± 0,002 | 0,23 |
| C3 + EtOH   | 0,33 / 1,34 ± 0,01 | 0,17 / 0,46 ± 0,02 | 0,50 / 0,030 ± 0,003 | 0,53 |
| C6          | 0,11 / 1,30 ± 0,01 | 0,16 / 0,41 ± 0,01 | 0,73 / 0,034 ± 0,001 | 0,23 |
| C6 + EtOH   | 0,14 / 1,35 ± 0,01 | 0,67 / 0,44 ± 0,02 | 0,19 / 0,030 ± 0,003 | 0,58 |
| C9          | 0,09 / 1,30 ± 0,01 | 0,15 / 0,35 ± 0,01 | 0,77 / 0,033 ± 0,001 | 0,19 |
| C9 + EtOH   | 0,36 / 1,36 ± 0,01 | 0,09 / 0,41 ± 0,03 | 0,55 / 0,020 ± 0,002 | 0,54 |
| C17N        | 0,20 / 1,57 ± 0,01 | 0,25 / 0,56 ± 0,01 | 0,55 / 0,074 ± 0,004 | 0,50 |
| C17N + EtOH | 0,58 / 1,39 ± 0,01 | 0,15 / 0,45 ± 0,03 | 0,27 / 0,045 ± 0,008 | 0,88 |

In allen Messungen mit EtOH-Zugabe führt eine Erhöhung der organischen Lösungsmittelkonzentration zu einer bathochromen Verschiebung der Spektren (Abb. 48 A und 48 B). Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer der Dendronstrukturen zeigt dabei ein komplexes Verhalten und eine starke Verkürzung bei niedrigen Interfluorophorabständen (Abb. 48 C). Auch mit Zugabe von EtOH bleibt diese Fluoreszenzlebenszeit komplex, steigt aber im Mittel an. Hierdurch konnte für den längsten Interfluorophorabstand eine mittlere amplitudengewichtete Lebenszeit, ähnlich zur jeweiligen Referenzmessung von Cy5, erreicht werden (Abb. 48 C und Tab. 9). Dennoch sind hier noch relativ stark verkürzte Fluoreszenzlebenszeitkomponenten enthalten (Tab. 9).

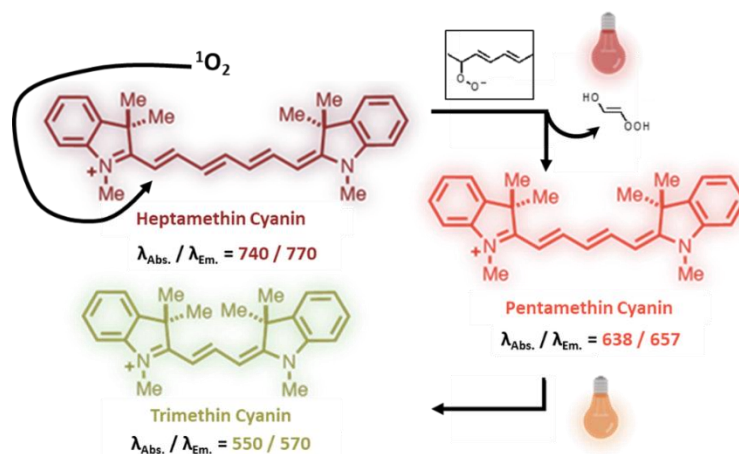
## 5 Diskussion

### 5.1 Photozerschneidung von Cyaninfarbstoffen

Aus den Ergebnissen in Abschnitt 4.1 ist zu erkennen, dass der Cyaninfarbstoff Cy5 bzw. Al647 einen photochemischen Mechanismus durchläuft, der dazu führt, dass das Absorptions- und das Emissionsspektrum dieses Farbstoffes hypsochrom verschoben ist (Abb. 14 A und 14 B). Hierbei nimmt molekularer Sauerstoff in der Lösung eine entscheidende Rolle ein. Hinweise darauf ergaben initiale Photozerstörungsexperimente. Darüber hinaus war ersichtlich, dass das Bleichen der Cyaninfarbstoffe Cy5 bzw. Alexa Fluor 647 stark von der Mikroumgebung des Farbstoffes abhängig ist (Abb. 13). So ist zu erkennen, dass Al647 gekoppelte Antikörper ein schnelleres Bleichverhalten zeigt, als die Referenz des freien, ungebundenen Farbstoffes (Abb. 13 A). Ebenso zeigten sich leichte Unterschiede beim Bleichverhalten bzw. der Photostabilität zwischen den chemisch und spektroskopisch ähnlichen Cyaninfarbstoffen Cy5 und Al647 (Abb. 13 A). Des Weiteren ist ersichtlich, dass verschiedene Pufferbedingungen und Pufferzusätze das Bleichverhalten des Farbstoffes Al647 ebenso stark beeinflussen (Abb. 13 und Abb. 16). Bei zeitlichen Emissionsmessungen in Ascorbinsäure oder bei Zugabe eines enzymatischen Sauerstoffentzugssystems zeigte sich kein Abfall der Fluoreszenzintensität, was auf eine photostabilisierende Wirkung der Pufferzusätze zurückzuführen ist. Eine Zugabe von Erythrosin B (EB) bewirkt hingegen einen sehr schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität (Abb. 13 C). Der Pufferzusatz Erythrosin B (EB) führt bei zusätzlicher Belichtung mit  $\sim 532$  nm zur photochemischen Erzeugung von reaktivem Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), der in der Natur als reaktionsträger Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ) vorliegt [69]. Diese reaktive Sauerstoffspezies führt, durch Reaktion mit dem konjugierten Doppelbindungssystem des belichteten Cyaninfarbstoffes, zur schnellen Photozerstörung desselben. Durch Entzug des molekularen Sauerstoffes ( $^3\text{O}_2$ ) oder durch Zugabe von Antioxidationsmitteln, wie Ascorbinsäure, werden Reaktionen mit Sauerstoff reduziert und ein schnelles Photobleichen des Farbstoffes verhindert. Bei diesen beschriebenen Pufferzusätzen kam es zu keiner Blauverschiebung des Absorptions- bzw. Emissionsspektrums, da einerseits molekularer Sauerstoff entzogen wurde (enzymatisches Sauerstoffentzugssystem) oder andererseits durch Antioxidationsmittel eine Reaktion des Farbstoffes mit Sauerstoff verhindert wurde (Ascorbinsäurezusatz). Die Zugabe von Erythrosin B führt zu einer schnellen Anreicherung von viel reaktiven Sauerstoffspezies ( $^1\text{O}_2$ ), die sofort jedlichen Farbstoff oder Intermediate davon oxidieren können. Dies führt zu einem rapiden Photobleichen der Farbstoffe. Auch wenn hier Photokonversion stattfindet,

können diese Produkte sofort mit reaktiven Sauerstoff weiterreagieren und die Farbstoffe zerstören. Unter Photoschaltbedingungen zeigt der Farbstoff einen rapiden Abfall des Fluoreszenzsignals und ein Stagnieren der Emission auf einen niedrigen Intensitätsniveau (Abb. 13 C). Dabei ist dieses Verhalten sowohl mit, als auch ohne Sauerstoffentzugssystem ähnlich. Unter thiolhaltigen Pufferbedingungen wird der photoschaltbare Cyaninfarbstoff Al647, nach Anregung, in einen emissionsunfähigen Zustand überführt und es stellt sich ein spezifischen Gleichgewicht aus Farbstoffen im "An-" und "Auszustand" ein [15, 16]. Dies zeigt das Stagnieren des Signals auf niedrigem Intensitätsniveau (Abb. 13 C). Dabei ist auch zu erkennen, dass es unter thiolhaltigem Photoschaltpuffer zu keiner blauverschobenen Fraktion im Absorptionsspektrum des belichteten Farbstoffes kommt (Abb. 13 D). Hierbei wirkt vermutlich die Reduktion der Farbstoffe durch Thiole als Konkurrenzreaktion bzw. als Gegenspieler zur Oxidation. Diese Ergebnisse führen aber zu der Annahme, dass Sauerstoff für die photoinduzierte Verschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrum von Cyaninfarbstoffen Cy5 bzw. Al647 verantwortlich ist. Des Weiteren zeigte die erniedrigte Fluoreszenzlebenszeit des photokonvertierten aufgereinigten Produktes der Cy5 Belichtungsexperimente, dass dieser eine relativ starke Ähnlichkeit zum Cyaninfarbstoff Cy3 aufweist, der ein kürzeres konjugiertes Doppelbindungssystem besitzt (Abb. 14 C). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Farbstoff Cy5 photochemisch zu einem Cy3 Farbstoff umgewandelt werden könnte. Von anderen Farbstoffklassen ist dabei bekannt, dass diese ähnliche Prozesse der Umwandlung der Farbstoffe aufweisen können, wobei sich dort ebenso die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe ändern. So ist beispielsweise von fluoreszierenden Proteinen, wie mEos3.2, bekannt, dass diese eine oxidative Elimination unterlaufen können und dabei das Absorptions- und Emissionsspektrum bathochrom verschoben wird [70]. Andere Farbstoffe, wie beispielsweise Rhodamine, können eine Dealkylierung unterlaufen, wodurch das Absorptions- und Emissionsspektrum hysochrom verschoben wird [71, 72, 73]. Von Cyaninen ist dahingegen nicht bekannt, dass diese Farbstoffklasse einen chemischen Mechanismus unterlaufen können, der zu einer Verschiebung der charakteristischen Spektren dieser Farbstoffe führt. In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Mechanismus entschlüsselt, der aufzeigt, dass für die Farbstoffklasse der Cyanine eine photochemische Umwandlung möglich ist. Ebenso wurde aufgezeigt, wie dieser Mechanismus verhindert bzw. reduziert werden kann. Dabei zeigten chemische Analysen von Dr. Siddharth S. Matikonda unter Leitung von Prof. Dr. Martin J. Schnermann am "Chemical

Biology Laboratory” des “National Cancer Institute” in Frederick (USA), sowie von Prof. Dr. Alexander Greer am Lehrstuhl für Chemie des Brooklyn College der “City University of New York” in Brooklyn, dass das konjugierte Doppelbindungssystem von Cyaninfarbstoffen durch reaktiven Singulett-Sauerstoff angegriffen wird und sich hierbei, durch Umlagerungen, dieses Doppelbindungssystem verkürzt, wodurch sich die Absorptions- und Emissionswellenlänge des belichteten Farbstoffes verschiebt. In Abbildung 49 ist die Umwandlung von Cyaninfarbstoffen und die Verkürzung des Doppelbindungssystems vereinfacht dargestellt.



**Abbildung 49: Schematische Darstellung der Photokonversion von Cyaninfarbstoffen.** Vereinfachte Darstellung der Verkürzung von Cyaninfarbstoffen. Als Ausgangsfarbstoff ist hier Heptamethin – Cyanin dargestellt, der bei Belichtung im nahen infraroten Bereich, unter bestimmten Pufferbedingungen, eine photoinduzierte Umwandlung zu einem Pentamethin-Cyaninfarbstoff und damit eine Blauverschiebung der jeweiligen Spektren zeigt. Hierbei nimmt Singulett – Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) eine entscheidende Schlüsselrolle ein. Diese reaktive Sauerstoffspezies greift das Doppelbindungssystem des Cyaninfarbstoffes an und führt damit zu Bildung eines zwitterionischen Peroxy – Intermediats des Farbstoffes (schwarze Umrandung). Durch Wasseraddition und weiteren Umlagerungen (nicht gezeigt) wird das Doppelbindungssystem durch Abgang eines Hydroperoxyethenol verkürzt. Dieser Prozess kann daraufhin beim neu entstandenen Pentamethin – Cyanin, bei Belichtung an dessen Absorptionsmaximum, ebenso in selber Art und Weise ablaufen, sodass ein verkürzter Trimethin-Cyaninfarbstoff entsteht. Wellenlängenangaben der Absorption und Emission in nm. Abbildung entnommen und modifiziert aus Manuskript 3 (Publikationsliste): <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>. Für weitere Verwendungen bezüglich dieses Materialauszuges ist ACS für Genehmigungen zu kontaktieren.

Durch Isotopenexperimente konnte von Dr. Siddharth S. Matikonda weiterführend dargelegt werden, dass dieser photochemische Prozess intramolekularer Natur ist und durch Umlagerungen innerhalb des Farbstoffes, nach Oxidation des Doppelbindungssystems, stattfindet. Dabei läuft die in Abbildung 49 dargestellte photoinduzierte Verkürzung des Doppelbindungssystems von Cy7 Farbstoffen zu Cy5 Farbstoffen bevorzugt in wässriger Umgebung bei einem basischen pH Wert ab. Neben diesem neuartigen Mechanismus der Verkürzung des Doppelbindungssystems von Cyaninfarbstoffen konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass diese photoinduzierte Zerschneidung und damit Verkürzung der

Cyaninfarbstoffe für die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie vorteilhaft genutzt werden kann. Die Effizienz der Umwandlung von Heptamethin Cyaninen zu Pentamethin Cyaninen zeigte sich in Lokalisationsmikroskopieaufnahmen im Weitfeld als zu gering, als dass hochqualitative rekonstruierte Bilder erzeugt werden konnten (Abb. 18). Es zeigte sich in den rekonstruierten Aufnahmen der mit Cy7 immunmarkierten Mikrotubulistrukturen keine durchgängige Struktur, was durch eine Umwandlungseffizienz von  $\sim 10 - \sim 20\%$  verursacht ist (Abb. 18). Dennoch konnten mithilfe eines neuronalen artifiziiellen Netzwerks, durchgeführt von Prof. Dr. Philip Kollmansberger am "Center for Computational and Theoretical Biology (CCTB)" der Julius-Maximilians Universität Würzburg, qualitativ hochwertige rekonstruierte Mikrotubulistrukturen generiert werden (Abb. 18). Darüber hinaus zeigte sich eine stark ausgeprägte Dimerschulter aus H-Aggregaten der Cy7-Farbstoff gekoppelten Antikörper (Abb. 17). Diese Dimerschulter führt zu einer Unterdrückung der Emissionsintensität der Antikörper gekoppelten Cy7-Farbstoffe (Abb. 17). Da sich am gekoppelten Antikörper hierbei ein Gleichgewicht aus Cy7 Monomeren und H-Dimeren einstellt, bietet sich bei den Weitfeldaufnahmen ein zeitliches Repertoire, weil vorwiegend monomerische Cy7-Farbstoffe umgewandelt werden, die daraufhin Cy5-Emission zeigen können (Abb. 17) [74, 75]. Dies zeigt sich im langsamen aber stetigem Anstieg der Cy7 – Emissionsintensität, sowie der stetig ansteigenden Cy5-Emissionsintensität (Abb 17 A). Dabei ist auch zu erkennen, dass mit ansteigendem Cy7 Emissionssignal über die Zeit, die H-Dimerschulter im Absorptionsspektrum des gekoppelten Antikörpers verringert wird (Abb. 17 B). Ebenso fällt auch die Absorptionsstärke über die Zeit, was auf den Prozess der Photozerstörung von Cy7-Farbstoffen und, zu einer gewissen Effizienz, der photoinduzierten Umwandlung von Cy7-Farbstoffen zu verkürzten Cy5-Farbstoffen zurückzuführen ist (Abb. 17). Anhand der langen Aufnahmezeit, im Vergleich zu herkömmlichen Cy5 *d*STORM-Messungen, und der längeren Rekonstruktionszeit bzw. dem Mehraufwand bei der Rekonstruktion, bietet sich hier allerdings kein Vorteil zu *d*STORM-Messungen unter Standardbedingungen. Wobei die Lokalisationsgenauigkeit der umgewandelten detektierten Cy5-Farbstoffe hier vergleichbar mit herkömmlichen *d*STORM-Aufnahmen mit Cy5-Farbstoffen unter Photoschaltbedingungen ist (Abb. 18 B). Im Vergleich dazu zeigten Lokalisationsmessungen mittels der Lokalisationsmikroskopiemethode DNA-PAINT einen deutlichen zeitlichen Vorteil gegenüber DNA-PAINT Methoden unter Standardbedingungen. Hierbei konnte mit einem 1000-fach höheren Überschuss an Cy7 markierten Belichtungssträngen (100 nM) gearbeitet werden, im

Vergleich zur Belichtungsstrangkonzentration der Vergleichsmessungen mit Cy5-gekoppelten Belichtungssträngen (100 pM). Die Werte der Bindezeiten der Belichtungsstränge steigen mit höherer Einzelbildbelichtungszeit an, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Zeit je Einzelbild berechnet und mit der entsprechenden Integrationszeit verrechnet wurde. Dies bedeutet, dass bei der Analyse ein Detektionsereignis eines gebundenen Emitters, auch wenn dieses zeitlich kürzer als die Integrationszeit war, für die gesamte Einzelbildaufnahmezeit zugeordnet wurde. Aus dem selben Grund sinkt auch mit steigender Belichtungszeit die Anzahl an eingefangenen Photonen / ms, da dieser Wert durch die jeweilige Integrationszeit geteilt wurde und die jeweiligen Emitter nicht für die komplett Einzelbildaufnahmezeit gebunden sind bzw. Photonen aussenden. Dies führt zu einer Überschätzung der Bindezeiten und Unterschätzung der Photonenzahl je ms für zu hohe Integrationszeiten (50 ms), sowie zu einer Unterschätzung der Bindezeiten für zu niedrige Integrationszeit (10 ms), wobei die Photonenzahl hier theoretisch besser abgeschätzt werden kann (Abb. 21 und Tabelle 1). In Anbetracht der Messungen bei 20 ms Integrationszeit, führt diese Konzentration an Cy7-gekoppelten Belichtungssträngen zu einer Verringerung der Zeit, in der kein umgewandelter Farbstoffstrang gebunden ist (Auszeit), um den Faktor  $\sim 2,4x$  (Maximum zu Maximum, Abb. 21), gemessen in histidinhaltigen Pufferbedingungen. Damit könnten theoretisch in der selben Aufnahmezeit mehr Cy5 umgewandelte Belichtungsstränge detektiert werden als beim Referenzansatz mit Cy5 gekoppelten Belichtungssträngen, was die Aufnahmezeit um eben diesen Faktor verkürzen würde. Allerdings war unter diesen Pufferbedingungen im Histogramm der Bindeereignisse keine klare Verschiebung des Maximums der Bindeereignisse der Cy5 photokonvertierten Farbstoffe zur Bindeereignisverteilung der Referenzmessung zu erkennen (Abb. 21). Dennoch ist auffällig, dass die Histogrammverteilung der Bindeereignisse der detektierten umgewandelten Cy5-Moleküle breiter ausfällt als die Bindeereignisse der Referenzmessung (Abb. 21). Allgemein lässt sich aber unter histidinhaltigen Bedingungen, bis auf die geringere Auszeit zwischen den Bindeereignissen, keine deutliche Verschnellerung der Aufnahmezeit mit dieser DNA-PAINT Methode der photoinduzierten Cy5 Umwandlung erzielen (Abb. 21 und Tab. 1). Unter Pufferbedingungen ohne Histidin konnte hingegen eine Verkürzung der Auszeit um den Faktor  $\sim 1,6$ , sowie eine Erhöhung der Bindeereignisse um einen ähnlichen Faktor ( $\sim 1,7x$ ) bei den DNA-PAINT Messungen der photoinduzierten Cy5 Umwandlung beobachtet werden (Abb. 21 und Tab. 1). Dies führt zu einer Beschleunigung der DNA-PAINT Aufnahmezeit um diesen Faktor. Diese wurden dabei durch den Vergleich der

jeweiligen Maxima der Histogramme in Abbildung 21 bestimmt. Die Effizienz der Umwandlung ist unter histidinhaltigen Bedingungen (pH 7,4) niedriger als in CAPSO-haltigen (pH 9,5) Pufferbedingungen, aber höher als in reinem Salzpuffer. Dies deuten ebenso die DNA-PAINT Messungen der photoinduzierten Cy5 Umwandlung an, bei denen die Emissionsintensität und die Bindezeit der Detektionsereignisse deutlich niedriger als beim DNA-PAINT Ansatz der Referenzmessung mit Cy5 gekoppelten Belichtungssträngen ist (Abb. 21 und Tab. 1). Hierbei könnte die Umwandlungseffizienz unter diesen Bedingungen für diese DNA-PAINT Methode noch zu hoch sein, sodass eine Cy7-Cy5 Umwandlung im evaneszenten Feld schon vor Bindung der Cy7 Belichtungsstränge am Zielstrang stattfindet. Dies würde zu einer Verringerung der Detektionszeit und der detektierten Emissionsintensität führen, was unter histidinhaltigen Bedingungen ersichtlich ist. Die Anzahl der Bindeereignisse zeigt hier in Abbildung 21 unter histidinhaltigen Bedingungen einen flacheren Abfall als bei den Bindeereignissen des Cy5-Referenzansatzes, was eine höhere Zahl an Bindungsereignissen andeutet aber nicht eindeutig aus dem Histogramm ersichtlich ist. Dies erschwert die Annahme einer Verschnellerung der Aufnahmezeit unter diesen DNA-PAINT Bedingungen. Dennoch konnte aus den photokonvertierten DNA-PAINT Messungen in histidinehaltigen Pufferbedingungen eine höhere räumliche Auflösung erzielt werden als bei der entsprechenden Referenzmessung mit Cy5 gekoppelten Belichtungssträngen, was mit der Erkenntnis der Bindezeiten und Auszeiten der umgewandelten Cy5 DNA-PAINT Messungen vermutlich auf ein reduziertes Hintergrundsignal zurückzuführen ist (Abb. 20). Im Vergleich hierzu führt eine Verringerung der Umwandlungseffizienz, durch DNA-PAINT Messungen ohne Histidinzusätze, zu einer Verschnellerung der Aufnahmezeit der photoinduzierten Cy7-Cy5 DNA-PAINT Methode. Dies führt zu der Annahme, dass eine schlechtere Umwandlungseffizienz vorteilhaft für diese DNA-PAINT Methode ist. Dennoch ist auch hier auffällig, dass auch unter histidinfreien Bedingungen die Bindezeit, im Vergleich zur Referenzmethode, verringert ist, wobei die Emissionsintensitäten für beide Methoden hier ähnlich sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch unter diesen Bedingungen die Umwandlungseffizienz noch zu hoch ist und hiermit noch nicht die optimalen Bedingungen dieser photoinduzierten DNA-PAINT Konvertierungsmethode gefunden wurde. Daher müssten in Folgeexperimenten weitere Bedingungen getestet werden, um diese Vermutung zu überprüfen und die Photokonvertierungseffizienz von Cy7 zu Cy5, beispielsweise durch Messungen in PBS mit L-Alanin-Zusätzen bei einem leicht saueren pH Wert, weiter künstlich zu reduzieren. Diese



Erkenntnisse der DNA-PAINT Messungen weisen darüber hinaus aber auch darauf hin, dass Histidin vorwiegend die photoinduzierte Umwandlung von Cy7 zu Cy5 beeinflusst bzw. begünstigt, während Cy5 zu Cy3 Photozerschneidungen davon anscheinend nicht beeinflusst werden, da die Werte dieser detektierten Ereignisse (Cy5 Referenzen) zwischen histidinhaltigen und -freien Bedingungen relativ ähnlich sind (Tabelle 1). Bezüglich der Weitfeldaufnahmen der Cy7 gekoppelten Antikörper gestaltet sich eine Optimierung der Messbedingungen als schwierig. Eine Erhöhung des Farbstoffkopplungsgrades am sekundären Antikörper und damit der Dichte der Farbstoffe an der Zielstruktur, um das Repertoire an konvertierbaren Farbstoffe zu erhöhen, würde die Wahrscheinlichkeit der Blockierung der Epitope der Antikörper ebenso erhöhen, was die Spezifität der Antikörper drastisch verringern würde. Da bei dieser Lokalisationsmethode ein konvertierter Farbstoff theoretisch nur einmal detektiert wird, würde das Auftreten einer Dimerschulter, wie zuvor beschrieben, eher vorteilhaft sein, weil hierbei ein zeitliches Repertoire an konvertierbaren einzelnen Cy7-Farbstoffen, durch das Gleichgewicht von Monomeren und Dimeren, aufgebaut werden würde. Für optimale Aufnahmebedingungen dieser Methode müsste die Farbstoffdichte an der Zielstruktur möglichst hoch sein und gleichzeitig die Markierungsart der Zielstruktur möglichst klein sein. Somit könnten als Folgeexperimente Cy7- bzw. Cy5-gekoppelte Dendronstrukturen (Abb. 12) genutzt werden, um diese Art der photoinduzierten Lokalisationsmikroskopie zu optimieren. Diese Dendronstrukturen könnten via Klick-Chemie an eine Zielstruktur in hoher Dichte angebracht werden, und würden durch ihren geringen Abstand der Farbstoffe zueinander (Abb. 12) wahrscheinlich zu H-Dimer Formationen der Farbstoffe führen, was ein zeitliches Repertoire der Photokonvertierung ermöglichen würde. Als Zielstruktur könnte eventuell TCO-modifiziertes Phalloidin genutzt werden, um das dichte zelluläre Aktinnetzwerk, beispielsweise in COS7-Zellen, zu markieren. Dennoch bleibt hier der beschriebene DNA-PAINT Ansatz als vielversprechendste Lokalisationsmikroskopiemethode zu erwähnen, da in relativ kurzer Zeit viele einzelne konvertierbare Cyanin-gekoppelte Belichtungsstränge an der Zielstruktur binden können und das Repertoire an Belichtungssträngen, durch die hohe Konzentration dieser in Lösung, sehr hoch ist. Kleinere Optimierungen dieser Methode, vor allem in Hinblick auf die Pufferbedingungen und die Photokonvertierungseffizienz, könnten diese Methode noch weiter beschleunigen und verbessern. Des Weiteren müsste noch abschließend analysiert werden, welchen chemischen Beitrag die jeweiligen Pufferbedingungen, beispielsweise CAPSO oder Histidin, leisten, um zu

verstehen wieso die Effizienz der photoinduzierten Umwandlung bzw. Verkürzung der Cyanine unter diesen Bedingungen ansteigt. Dennoch muss bei Experimenten mit Cyaninfarbstoffen, vor allem bei Energieübertragungsexperimenten wie FRET-Analysen, dieser Mechanismus der Blauverschiebung von Cyaninfarbstoffen berücksichtigt werden, um Fehlinterpretationen zu verhindern. Um dies zu minimieren bzw. auszuschließen und damit die Reaktion von Cyaninen mit Singulett-Sauerstoff in Lösung zu unterdrücken, könnten allerdings Pufferbedingungen mit Antioxidationsmitteln oder Sauerstoffentzugssystem gewählt werden.

## 5.2 Photophysikalisches Verhalten mehrfach markierter Antikörper unter *d*STORM-Bedingungen

In dieser Arbeit konnten sekundäre IgG-Antikörper mit diversen Farbstoffkopplungsgraden generiert werden. Hierbei wurden primäre Amine der zugänglichen Lysinaminosäuren der Antikörper über NHS-Reaktionen mit Farbstoff kovalent gekoppelt. Dabei lassen sich diese Kopplungsgrade wahrscheinlich nicht exakt reproduzieren, da ein solcher sekundärer IgG-Antikörper typischerweise bis zu  $\sim 80$  Lysine beinhaltet, die dabei in großer Zahl auch oberflächenexponiert sind [76]. In der vorliegenden Arbeit konnten Al647-Kopplungsgrade von  $\sim 1,1$ ,  $\sim 2,1$ ,  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$ , sowie Cy5-Kopplungsgrade von  $\sim 1,1$  und  $\sim 3,7$  generiert werden. Dabei ist zu beachten, dass die angegebenen Kopplungsgrade der Antikörperlösungen nicht exakt sind, sondern die jeweilige Antikörperlösung eine Vielzahl an Kopplungsgraden beinhaltet, die einer Poisson-Verteilung folgen [31]. Darüber hinaus ist weitestgehend bekannt, dass Cyaninfarbstoffe, wenn sie sich in räumlicher Nähe befinden, je nach Orientierung der jeweiligen Dipole, Aggregate aus H- oder J-Dimeren ausbilden können (Abb. 4) [77, 78]. Die verwendeten IgG-Antikörper weisen dabei gewöhnlich eine Größe von  $\sim 10$  nm auf [28]. Hierbei steigt, bei diesen Dimensionen des genutzten Antikörpers, mit steigendem Kopplungsgrad auch die Wahrscheinlichkeit der Farbstoffinteraktionen an, was auch in den spektroskopischen Ergebnissen zu den gekoppelten Antikörpern zu sehen ist (Abb. 22). Die Stärke der Verschiebung der jeweiligen Spektren der Dimere bzw. die Bildung der Dimere hängt dabei neben den Dipolorientierungen auch stark von der jeweiligen Distanz ( $R$ ) zwischen den Farbstoffen ab ( $R^3$ ) [43, 44]. Die in dieser Arbeit analysierten Kopplungsgrade weisen mit steigendem Kopplungsgrad H-Dimere auf, deren Emission im Ensemble stark unterdrückt ist (Abb. 4). Dabei ist zu erkennen, dass Cy5 gekoppelte Antikörper, höheren

Kopplungsgrades, eine stärkere H-Dimer Absorption aufweisen, als die jeweiligen Spektren der Al647 gekoppelten Antikörper. Dies ist vermutlich auf die höhere Löslichkeit der Al647 Farbstoffe in wässrigem Milieu zurückzuführen, die zwei Sulfonsäureseitenketten mehr besitzen als der Cyaninfarbstoff Cy5. Die Cyaninfarbstoffe sind darüber hinaus aber strukturell und spektroskopisch nahezu identisch (Abb. 22). Je höher diese H-Dimer Absorption im Spektrum ausfällt, desto niedriger ist die Intensität der jeweiligen Emission im Ensemble. Dies ist auch in der Fluoreszenzquantenausbeute zu sehen, die bei den Al647 gekoppelten Antikörpern niedriger Kopplungsgrade leicht ansteigt, bevor diese mit steigendem Kopplungsgrad drastisch fällt, was auf die Formation von H-Dimeren zurückzuführen ist. Die Ausbildung dieser H-Dimere ist dabei nicht auf intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern zurückzuführen und damit nicht konzentrationsbedingt, sondern aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen am selben Antikörper ausgelöst (Abb. 23 A). Diese starken Farbstoffwechselwirkungen sind dabei auch in den Messungen der Fluoreszenzlebenszeit zu sehen (Abb. 22). Hierbei weisen Antikörper mit einem niedrigeren Al647 Kopplungsgrad ( $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$ ), im Vergleich zur Referenz des ungebundenen Al647 Farbstoffes (monoexponentielle Anpassung), eine etwas komplexere Abklingkurve (biexponentielle Anpassung) und eine erhöhte amplitudengewichtete mittlere Fluoreszenzlebenszeit auf (Abb. 22 A). Dieses Phänomen ist auch bei Cy5 gekoppelten Antikörpern mit niedrigem Kopplungsgrad zu beobachten (Abb. 22 B). Dieses Verhalten ist für Cyaninfarbstoffe bereits bekannt und vermutlich auf eine veränderte Wahrscheinlichkeit der cis-trans Isomerisierungsübergänge nach Proteinkopplungen zurückzuführen [79, 80]. Hierbei wurden die Abklingkurven aller Kopplungsgrade mit einer biexponentiellen Funktion angepasst. Die mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer fällt dabei für steigende Al647 Kopplungsgrade stark ab, während die mittlere Fluoreszenzlebensdauer eines höheren Cy5 Kopplungsgrades, einen zum freien Cy5-Farbstoff ähnlichen Wert erreicht. Dieser Abfall der mittleren Fluoreszenzlebenszeit mit steigendem Kopplungsgrad ist auf Fluoreszenzlöschereignisse zwischen den Farbstoffen zurückzuführen. Wie komplex diese Löschereignisse sind, ist auch in den jeweiligen Fluoreszenzkorrelationskurven zu sehen (Abb. 24). Dort zeigt die Referenz des freien ungebundenen Al647 Farbstoffes neben der Diffusionszeit nur eine weitere Amplitude. Diese Amplitude ist auf die farbstofftypische cis-trans Isomerisierung zurückzuführen [80]. Bei den restlichen Al647 Proben steigender Kopplungsgrade ist dahingegen ein komplexes Verhalten mehrerer Amplituden zu beobachten,

die schwierig zu interpretieren sind. Diese Amplituden sind neben der Dimerisierung der Farbstoffe am Antikörper auch auf komplexe Fluoreszenzlöschprozesse aufgrund von starken und schwachen Farbstoffinteraktionen zurückzuführen. Daneben weisen auch Messungen der Fluoreszenzanisotropie auf Energieübertragungsprozesse zwischen den gekoppelten Farbstoffen hin. Hier steigt die Polarisation der Emission bei niedrigen Al647 Kopplungsgraden an (Abb. 25). Dies ist vermutlich auf bestimmte Wechselwirkungen des Farbstoffes mit den Aminosäuren des Antikörpers zurückzuführen. Für steigende Kopplungsgrade fällt der errechnete Wert der Fluoreszenzanisotropie ab, was auf Energieübertragungen zwischen den am Antikörper gekoppelten Farbstoffen zurückzuführen ist, was zu einer Depolarisation des Fluoreszenzlichtes führt. Hierbei werden ähnliche Werte für höhere Kopplungsgrade erzielt, wie bei einem ungebundenen Farbstoff, der frei rotieren kann. Dies ist neben den Werten der mittleren Fluoreszenzlebenszeit ein starker Hinweis darauf, dass sich Antikörper höheren Kopplungsgrades, bis auf einzelne Ausnahmen, in einfachen neutralen Salzpufferbedingungen, wie ein multichromophores System aus miteinander kommunizierender Farbstoffe, verhalten. In dieser Arbeit wurde ebenso gezeigt, dass dieses Verhalten der Kopplungsgrade für Fluoreszenzaufnahmen bzw. bildgebende Fluoreszenzlebenszeitaufnahmen vorteilhaft genutzt werden kann (Abb. 26). Dabei ergeben sich die Vorteile, dass einerseits hier keine chromatische Aberration auftritt, da derselbe Farbstoff genutzt wird, und andererseits mit nur einer Anregungswellenlänge in einer einfachen Phosphat gepufferten Salzlösung neutralen pH-Wertes gemessen werden kann. Dennoch ist zu erkennen, dass höhere Kopplungsgrade zu einem Anstieg des Hintergrundsignals, aufgrund unspezifischer Bindungen der Antikörper, führen (Abb. 26 und Abb. 27) [31]. Diese unspezifisch bindenden Antikörper höherer Kopplungsgrade zeigten dabei eine höhere mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer, als spezifisch gebundene Antikörper (Abb. 26), was die Interpretation und Unterscheidung der verschiedenen Zielstrukturen erschweren kann. Dennoch konnten aufgrund der stark unterschiedlichen mittleren amplitudengewichteten Lebenszeiten zwischen Antikörpern höheren und niedrigeren Kopplungsgrades, diverse zelluläre Zielstrukturen spezifisch immunomarkiert und anhand ihrer Lebenszeit getrennt abgebildet werden (Abb. 26) [24].

Unter Photoschaltbedingungen verhalten sich die Farbstoffe diverser Kopplungsgrade aber wie einzelne Farbstoffe. Hierbei werden unter thiolhaltigen Bedingungen scheinbar Farbstoffwechselwirkungen und Farbstoffinteraktionen, wie die Formation von H-Dimeren,

destabilisiert (Abb. 23 B). Dies zeigen die Einzelmoleküldaten der zeitlichen Verfolgung der Fluoreszenzeigenschaften der Antikörper diverser Kopplungsgrade der *d*STORM-Daten gemessen im Weitfeld. Hier unterscheiden sich die analysierten Werte der Fluoreszenzintensitäten, Anzeiten und Auszeiten der Emitter, sowie die Werte der Lokalisationsgenauigkeit der Emitter der unterschiedlichen Kopplungsgrade nicht (Tabelle 3 und Tabelle 4), was in starkem Kontrast zu den Ensembledaten unter einfachen neutralen Salzpufferbedingungen steht. Unter Sauerstoffentzugssystem werden hier die längsten Auszeiten der Emitter erzielt, was auf die Reduktion der molekularen Sauerstoffkonzentration in Lösung zurückzuführen ist, der als Triplettlöscher der Cyaninfarbstoffe fungiert [15, 16]. Unter UV-Belichtungen mit Sauerstoffentzugssystem im Photoschaltpuffer werden Auszeiten, ähnlich zu MEA-haltigen Pufferbedingungen ohne Sauerstoffentzugssystem, erreicht. Dies ist auf die schnellere Reaktivierung der im Auszustand befindlichen Farbstoffe bei  $\sim 405$  nm zurückzuführen, da dieser Zustand bei dieser Wellenlänge anregbar ist, wodurch die Farbstoffe wieder in ihren normalen, im roten Farbspektrum anregbaren, Zustand zurückgeführt werden [15, 16]. Die bildbasierte Bestimmung der Auflösung mittels Fourier-Ringkorrelation zeigt für alle Aufnahmebedingungen der Mikrotubulimessungen relativ ähnliche Werte, wobei für höhere Kopplungsgrade die höchsten Werte und damit die niedrigste Auflösung bestimmt wurde, was auf ein höheres Hintergrundsignal durch unspezifische Antikörperbindungen mit der Oberfläche zurückzuführen ist. Niedrigere Kopplungsgrade zeigen dahingegen, mit FRC-Werten um  $\sim 20$  nm, die höchste bildbasierte Auflösung. Diese bildbasierte Auflösungsbestimmung wurde für die Einzelmüloberflächen nicht durchgeführt, da hier keine Struktur für die Bestimmung dieser vorhanden war. Hier wurde lediglich die Lokalisationsgenauigkeit bestimmt, deren Auflösung hiermit ebenso abgeschätzt werden kann. Hier zeigt die Lokalisationsgenauigkeit für alle Kopplungsgrade sehr ähnliche Werte. Dieses Verhalten unter Photoschaltbedingungen und dem damit einhergehende starken Kontrast dieses Verhaltens zu den Ensembledaten unter thioolfreien Bedingungen könnte, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, ein Gleichgewicht aus Monomeren und H-Dimeren, das sich in wässriger Umgebung einstellt, zugrundeliegen, was literaturbekannte Studien belegen [74, 75]. Dabei werden bevorzugt Al647 Farbstoffe im monomeren Zustand aufgrund des höheren molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) angeregt [81]. Hierdurch werden angeregte monomere Al647 Farbstoffe aus dem Monomer-Dimer Gleichgewicht entfernt und über Interkombination (engl. Intersystem crossing, ISC) in einen

Triplett-Zustand überführt, der durch Reaktion mit Thiolen in einen langlebigen "Auszustand" überführt werden kann [82, 83]. Da die Lebenszeit des "Auszustandes" des Al647 Farbstoffes  $\sim 1000$ -fach höher liegt als die des "Anzustandes", wird dieser Zustand des Farbstoffes unter dSTORM-Bedingungen verstärkt angehäuft, bevor dieser wieder in den absorptionsfähigen Grundzustand überführt wird. Unter thiofreien Bedingungen ist dies nicht der Fall, hier wird die Emissionsfähigkeit vorwiegend durch das Gleichgewicht aus Monomeren und fluoreszenzunfähigen H-Dimeren bestimmt. Dies zeigen auch die Fluoreszenzkorrelationspektroskopiedaten. Zur Weiteren Analyse und Interpretation dieses Verhaltens wurden konfokale Punktmessungen einzelner gekoppelter Antikörper durchgeführt und die Photonenkoinzidenz der ankommenden Photonen bestimmt. Um die Aufnahmezeit unter thiofreien Bedingungen zu erhöhen und die Photostabilität der gekoppelten Cyaninfarbstoffe zu steigern, wurde Sauerstoff enzymatisch aus der Lösung entfernt und darüber hinaus ein Reduktions – Oxidations Puffersystem bestehend aus Trolox/Troloxquinon verwendet [84, 85]. Die Daten der Oligonukleotidmessungen in Trolox/Troloxquinon-Puffern und in Photoschaltpuffer zeigten, dass die Systemkonfiguration für Photonenkoinzidenzbestimmungen sensitiv genug und daher geeignet ist (Abb. 28). Unter troloxhaltigen Bedingungen zeigte sich, dass niedrigere Kopplungsgrade ein klassisches Verhalten der Fluoreszenzintensität zeigten. Dabei waren einmalige Photobleichschritte (DOL  $\sim 1,1$ ) oder zweifache Bleichschritte (DOL  $\sim 2,1$ ) zu erkennen mit entsprechenden Photonenkoinzidenzwerten von einfachen Farbstoffen bzw. zwei Farbstoffen (Abb. 30). Darüber hinaus konnten auch vereinzelt vierfache Bleichschritte beim Kopplungsgrad 4,1 beobachtet werden, mit absinkenden Photonenkoinzidenzwerten je Bleichschritt (Abb. 31 A und 31 B). Dieses Verhalten spricht für ein unabhängiges Fluoreszenzverhalten der Farbstoffe und keine Farbstoffinteraktion. Dies ist für den Kopplungsgrad von  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$  auch zu erwarten und kann je nach Kopplungsort am Antikörper zu einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch beim Kopplungsgrad von  $\sim 4,1$  auftreten. Vermehrt wurde unter dieser Pufferbedingung für höhere Kopplungsgrade aber ein durchaus komplexes zeitliches Fluoreszenzverhalten aus stark fluktuierenden Fluoreszenzintensitäten registriert und damit keine klaren Bleichschritte beobachtet (Abb. 30). Dabei zeigen die Werte der Photonenkoinzidenzen, dass durchschnittlich mehr als zwei Farbstoffe gleichzeitig emittieren, was für ein multichromophores System spricht (Abb. 30) [29, 86, 87, 88]. Des Weiteren zeigten allerdings einige der Fluoreszenztrajekturen der höheren Kopplungsgrade ein starkes Fluktuieren der

Fluoreszenz zu Beginn der Messung, bzw. über die gesamte Messzeit, das stark an ein Blinkverhalten wie unter Photoschaltpuffern erinnert (Abb. 31 C und 31 D). Diese Trajekturen zeigten sowohl beim Kopplungsgrad  $\sim 4,1$ , als auch beim Kopplungsgrad  $\sim 8,3$  eine niedrige Photonenkoinzidenzrate, was für nur 1 – 2 zeitgleich emittierende Farbstoffe spricht (Abb. 31 C und 31 D). Zusammen mit den Daten der Anisotropiemessungen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass hier, aufgrund der Größe der Antikörper und des hohen Kopplungsgrades, Farbstoffe lokal angehäuft sind, und damit miteinander kommunizieren können [89]. Hierbei können strahlungslose Energieübertragungsprozesse eines angeregten Farbstoffes auf einen benachbarten Farbstoff stattfinden. Diese Annihilationsprozesse könnten hier von  $S_1$  zum  $T_1$  oder auch von  $S_1$  zum  $S_1$  eines sich im Interaktionsabstand befindlichen Farbstoffes stattfinden, wenn diese Zustände in Resonanz sind (Abb. 2), was in nur einem emittierenden Farbstoff resultieren würde [29]. Daneben können auch strahlungslose elektronische Energietransfere eines angeregten Farbstoffes auf einen sich im Grundzustand befindlichen Farbstoff stattfinden. Dies ist sowohl von der Distanz ( $R^6$ ) zwischen den beteiligten Farbstoffen, als auch vom Winkel zwischen den Dipolmomenten und vom Überlappungsintegral der Farbstoffe abhängig (Abb. 3A). Da die beteiligten Farbstoffe eine geringe Stokes – Verschiebung aufweisen, ist das Überlappungsintegral ausreichend hoch, sodass hier “Homo”-FRET auftreten könnte, wie es auch in der pflanzlichen Natur in Lichtsammelkomplexen vorkommt [29, 86, 87, 90]. Diese Prozesse würden die Wahrscheinlichkeit mehrerer simultan emittierender Farbstoffe reduzieren, was die niedrigen Photokoinzidenzwerte bei höherem Kopplungsgrad, sowie das auftretende schnelle Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenztrajekturen, erklärt. In Photoschaltpuffer zeigt sich für niedrige Kopplungsgrade (DOL  $\sim 1,1$  und  $\sim 2,1$ ) ein durchaus charakteristisches Blinkverhalten der Fluorophore, die ebenso niedrige Photokoinzidenzwerte aufweisen (Abb. 30). Die Kopplungsgrade  $\sim 4,1$  und  $\sim 8,3$  zeigen dahingegen wiederum ein komplexes stark fluktuiertes Intensitäts- und Blinkverhalten, weisen allerdings, im Kontrast zu den Werten der Troloxmessungen, niedrige Photonenkoinzidenzwerte auf (Abb. 30). Dies spricht ebenso für wenige simultan emittierende Fluorophore und Annihilationsprozesse der Farbstoffe. Darüber hinaus zeigen diese höheren Kopplungsgrade in Photoschaltpuffer vor allem zu Beginn der konfokalen Messungen ein regelrechtes Feuerwerk an Blinkereignissen, die allerdings ebenso einen niedrigen Photonenkoinzidenzwert aufweisen. Dieses extreme Blinkverhalten kann in den Weitfeldaufnahmen nicht beobachtet bzw. detektiert werden, da

einerseits die zeitliche Sensitivität geringer ist und hier andererseits vor den Messung die Farbstoffe, vor allem bei Strukturen höherer Farbstoffdichte, wie beispielsweise bei den immunomarkierten Mikrotubuliaufnahmen, erst einige Sekunden bis Minuten, für ein Gleichgewicht aus "An-" und "Auszustand" der Farbstoffe, belichtet werden müssen, damit qualitativ hochwertige, Schaltartefakt – freie, Aufnahmen generiert werden können. Durch das Verpassen dieser schnellen Blinkereignisse im Weitfeld, würden damit alle Aufnahmen ähnliche Ergebnisse und Werte generieren, da bei höheren Kopplungsgraden vor allem zu Beginn durch Energieübertragungsprozesse bzw. permanente Anregung schon einige Farbstoffe zerstört sein könnten. Dieses schnelle Blinkverhalten höherer Kopplungsgrade könnte, neben den bereits erwähnten Annihilationsprozessen, auch auf Photoaktivierungsprozesse, von sich im Auszustand befindlichen Fluorophoren, zurückzuführen sein. Auch wenn mehrere Farbstoffe zeitgleich im angeregten Zustand sind, könnte die Energie auf einen Farbstoff niedrigeren Energieniveaus übertragen werden, was zusammen mit den bereits erwähnten Prozessen die Wahrscheinlichkeit simultaner Emissionen mehrerer Farbstoffe weiter verringern würde. Diese Ergebnisse zeigen ebenso, dass qualitativ hochwertige *d*STORM-Aufnahmen mit niedrigen Kopplungsgraden generiert werden können, wohingegen bei höhere Kopplungsgrade, die Wahrscheinlichkeit des Blockens der Bindungsepitope steigt, was vermehrt zu unspezifischen Bindungen der Antikörper und damit verbunden zu vermehrten Hintergrundsignal führt. Darüber hinaus zeigen höhere Kopplungsgrade ein komplexes Blinkverhalten resultierend aus Annihilationsprozessen interagierender Farbstoffe, was dazu führt, dass diese Kopplungsgrade unter *d*STORM-Bedingungen ein Feuerwerk an Blinkereignissen zu Beginn der Messung zeigen. Diese Ereignisse können im Weitfeld nicht erfasst werden, sodass durch Farbstoffzerstörung schon nach wenigen Sekunden bis Minuten keine Unterschiede mehr zu niedrigen Kopplungsgraden im Bezug auf die Fluoreszenzintensität und die "An-" und "Auszeit" der Farbstoffe ersichtlich sind. Da die Abstände zwischen den gekoppelten Fluorophoren, aufgrund der Vielzahl an oberflächenexponierten Lysinen [76], unbekannt ist, können hier keine spezifischen Aussagen zu den Löschungs- bzw. Energieübertragungsprozessen getroffen werden, die zum spezifischen Blinkverhalten zu Beginn der Messungen unter konfokalen *d*STORM-Bedingungen und zur drastisch Fluoreszenzlebenszeiterniedrigung hoher Kopplungsgrade beitragen. Allerdings geben Analysen des im nächsten Abschnitt diskutierten definierten Systems Aufschluss über die



komplexen Lösereignisse, die zu diesen Phänomenen führen können, und vermutlich auch hier eine entscheidende Rolle spielen. Daneben können diese Annihilationsprozesse höherer Kopplungsgrade allerdings in thiofreien Puffern vorteilhaft für Mehrfarbenaufnahmen genutzt werden, wenn man diese Farbstoffe bzw. gekoppelten Antikörper in Bezug auf die jeweilige spezifische Fluoreszenzlebenszeit analysiert (Abb. 26).

### **5.3 Analyse abstandsabhängiger photophysikalischer Effekte von Cyaninfarbstoffen unter dSTORM-Bedingungen im sub-10 nm Bereich**

Zur Analyse des Blinkverhaltens sich annähernder Cyaninfarbstoffe im sub-10 nm Bereich wurden erfolgreich DNA-Origami Konstrukte synthetisiert (Abb. 33 und Abb. 34). Dabei wurden jeweils vier Cy5 gekoppelte Oligosequenzen im Abstand von 18 nm, 9 nm, 6 nm und 3 nm quadratisch eingebaut (Abb. 33). Da die Konzentration der jeweiligen hybridisierten Origamilösungen maximal  $\sim 10$  nM betrug, wurden hiervon keine Ensembledaten zur Analyse aufgenommen, da die Konzentration für aussagekräftige Daten zu gering war. Daher wurden die hybridisierten Origamis auf Einzelmolekülebene im Weitfeld und konfokal sowohl unter dSTORM-Bedingungen, als auch unter photostabilisierenden Bedingungen analysiert. Die jeweiligen zu analysierenden Origamis diverser Farbstoffabstände wurden dabei via Avidin-Biotin Bindung auf gereinigten, Serumalbumin-präparierten, Glasoberflächen immobilisiert. Im Weitfeld konnten die DNA-Origami Konstrukte unter dSTORM-Bedingungen mit einem Interfluorophorabstand von 18 nm erfolgreich aufgelöst werden, sodass vier klar separierte Fluoreszenzpunkte im Abstand von  $\sim 20$  nm zu beobachten waren (Abb. 35). Die Konstrukte der Farbstoffabstände  $\leq 9$  nm konnten hingegen nicht aufgelöst werden, da hier die rekonstruierten Fluoreszenzpunkte miteinander verschwimmen bzw. verschmieren (Abb. 35). Dies lässt sich auch aus der Lokalisationsgenauigkeit dieser Methode ableiten (Abb. 40). Des Weiteren war bei den Aufnahmen des 18 nm Konstruktes ersichtlich, dass nur wenige aufgelöste 4er Origamikonstrukte zu sehen waren, was auf wenige Origami Konstrukte hinweist, die jeweils 4 Farbstoff-gekoppelte Oligonukleotidsequenzen inkorporiert haben (Abb. 35) [91, 92, 93]. Dies ist auch aus den Daten des Fluoreszenzverhalten der Origami Konstrukte zu sehen (Abb. 36 und Tab. 5). Hier lagen die Auszeiten des 18 nm und 9 nm Origami Konstruktes  $\sim 2,6$ -fach niedriger als die entprechenden Daten der Auszeit des Referenz-Origami Konstruktes. Die Daten der Blinkereignisse für das 18 nm und 9 nm DNA-

Origami Konstrukt implizierten mit  $\sim 4,5$  (Medianwerte) nahezu vollständig 4fach markierte DNA-Origami Konstrukte, da theoretisch ein  $\sim 4$  mal höherer Wert der Blinkereignisse bei diesen Abständen im Vergleich zur Referenz zu erwarten ist (Tab. 5). Im Hinblick auf die Histogramme der entsprechenden Daten der Blinkereignisse ist zu erkennen, dass die Verteilung der jeweiligen Konstrukte ein relativ breites Spektrum aus mehreren Spitzen aufweist. Dies weist hier allerdings auf DNA-Origami-Subpopulationen hin, die teilweise nur 2 – 3 Cy5 gekoppelte Oligonukleotidsequenzen inkorporiert haben und nur wenige 4-fach Cy5 markierte DNA-Origami Konstrukte vorliegen (Abb. 36). Vergleicht man die jeweiligen Maximalwerten der Histogramme der Blinkereignisse des 18 nm, 9 nm und des Referenz DNA-Origami Konstrukts (Abb. 36), dann fällt auf, dass das 18 nm und 9 nm DNA-Origami Konstrukt einen  $\sim 2,3$ -fach bzw.  $\sim 3$ -fach höheren Wert an Bindungsereignissen besitzt als das Referenzkonstrukt. Dies spiegelt, zusammen mit den Werten der jeweiligen Auszeiten, die mittlere Anzahl an inkorporierten Cy5-Oligonukleotidsequenzen, die damit im Mittel nicht vierfach markiert sind. Bei niedrigeren Abständen (6 nm und 3 nm) treten hier allerdings photophysikalische Effekte auf, die dazu führen, dass die Blinkereignisse der 6 nm DNA-Origami Konstrukte um  $\sim 9,4$  (Median) und die Werte des 3 nm Origami Konstrukt um  $\sim 2,7$  (Median) höher liegen als die entsprechenden Werte der Referenz (Tab. 5). Dies ist auch an der breiten Histogrammverteilung (6 nm) der Blinkereignisse zu erkennen, wobei die Verteilung des 3 nm Konstrukts sehr steil abfällt (Abb. 36). Darauf weisen auch die entsprechenden Werte der Auszeiten der 6 nm und 3 nm DNA-Origami Konstrukte hin, da hier die Auszeit der 6 nm Konstrukte  $\sim 6,5$ -fach niedriger liegt als die Referenz, bei einem Interfluorophorabstand von 3 nm leicht ansteigt und damit nur noch  $\sim 3,8$ -fach niedriger liegt als die Werte der Auszeit der Referenz (Tab. 5). Theoretisch ist hier zu erwarten, dass die Auszeit mit sinkenden Abstand entsprechend weiter abnimmt. Aus der Histogrammverteilung der Auszeit des 3 nm Origami Konstruktes, ist zu erkennen, dass hier das Maximum der Verteilung nahe 0 liegt, sodass hier im Weitfeld die Auszeiten des 3 nm DNA-Origami Konstruktes wahrscheinlich, mit einer zeitlichen Auflösung von 5 ms, nicht genau bestimmt werden können (Abb. 36). Dafür spricht auch die optische Wahrnehmung während der Aufnahme der 3 nm DNA-Origami Konstrukte, bei denen zu Beginn der Messung (und während dem Fokussieren der Probe vor der Messung unter schwacher Belichtung) ein starkes "Flackern" der Emitter zu erkennen war. Die Werte der Fluoreszenzintensitäten und der Anzeiten der jeweiligen Emitter der DNA-Origami Konstrukte wiesen dabei keinen großen

Unterschied auf und waren nahezu identisch für alle Konstrukte. Betrachtet man die zeitlichen Intensitätstrajektoren einzelner Fluoreszenzpunkte der Aufnahmen im Weitfeld, ist ersichtlich, dass die DNA-Origami Konstrukte der 18 nm und 9 nm Interfluorophordistanzen mehrfach markiert sind, da hier, im Vergleich zu Referenz, klar zu erkennen ist, dass die Anzahl der Blinkereignisse dieser Origami Konstrukte um ein vielfaches höher ist (Abb. 37). Bei diesen Abständen ist eine Farbstoffinteraktion nicht zu erwarten, sodass hier lediglich das Blinkverhalten der einzelnen inkorporierten Cy5 Farbstoffe zu erkennen ist. Die Intensität der Emission weist hier ein einheitliches Niveau auf mit vereinzelt Anstiegen der Fluoreszenzintensitäten. Dies könnte auf eine selten auftretende, gleichzeitige Emission von zwei unabhängigen Cy5 Farbstoffen hinweisen, wobei diese Ereignisse anhand der Blinkspuren relativ selten auftreten (Abb. 37). Allerdings zeigte auch die Referenz, bei der nur ein Cy5 gekoppelter Oligonukleotidstrang eingebaut ist, teilweise eine leichte Fluktuation der Emissionsintensität (Abb. 37). Betrachtet man die entsprechenden Fluoreszenztrajektoren der 6 nm DNA-Origami Konstrukte, ist eine stärkere Fluktuation der Emissionsintensität zu erkennen (Abb. 37). Darüber hinaus ist teilweise zu erkennen, dass hier bei einem Interfluorophorabstand von 6 nm ein "Flackern" und damit starkes Blinken zu Beginn der Messung auftritt (Abb. 37). Dies spricht, wie bei der Analyse der mehrfach markierten Antikörper, für starke energetische Farbstoffinteraktionen. Bei Interfluorophorabständen von 3 nm ist dieses Phänomen bevorzugt zu beobachten (Abb. 37). Dies zeigte sich, wie bereits erwähnt, auch schon beim Fokussieren dieser Probe. Nach diesem Phänomen zeigt sich in den entsprechenden Fluoreszenztrajektoren der Weitfeldaufnahmen nur noch ein seltenes vereinzelt Blinken der Farbstoffe (Abb. 37). Dies verfälscht bzw. verschmiert die analysierten Daten des Fluoreszenzverhaltens der 3 nm und evtl. der 6 nm DNA-Origami Probe im Weitfeld (Abb. 36 und Tab. 5), was erklären würde, dass beim 3 nm Origami Konstrukt die Auszeit, im Vergleich zur 6 nm Probe, wieder ansteigt, da dieses "Flackern" bzw. starke Blinkverhalten vorwiegend beim 3 nm Origami Konstrukt auftritt. Des Weiteren könnte die zeitliche Auflösung der Weitfeldaufnahmen zu gering sein und/oder einzelne Fluorophore bereits vor Beginn der Aufnahmezeit photozerstört worden sein, sodass auch deshalb das starke Blinkverhalten nicht erfasst werden kann und die Daten hier durch fehlende bzw. photozerstörte Fluorophore zusätzlich verschmiert werden. Im Vergleich dazu wurden auch DNA-PAINT-Aufnahmen dieser DNA-Origami Konstrukte gleicher Abstände durchgeführt. Bei dieser Methode finden keine Fluorophorinteraktionen statt, da die Farbstoff-gekoppelten

Belichtungsstränge einzeln an die Zielsequenz am DNA-Origami binden, und somit mit einer relativ geringen Wahrscheinlichkeit mehrere gekoppelten Belichtungsstränge simultan am DNA-Origami gebunden sind. Mit dieser Methode konnten DNA-Origami Konstrukte mit einem Abstand von 18 nm und 9 nm teilweise aufgelöst werden. Ab einem Interfluorophorabstand von 6 nm verschwimmen die rekonstruierten Fluoreszenzpunkte überwiegend, sodass die DNA-Origami Konstrukte mit einem Farbstoffabstand von 6 nm und 3 nm nicht aufgelöst werden konnten (Abb. 38). Aufgrund der höheren Lokalistationsgenauigkeit dieser Methode können Interfluorophorabstände von 18 nm und 9 nm bestimmt und aufgelöst werden (Abb. 38 und Abb. 40). Dabei zeigen die aus den rekonstruierten Abbildungen bestimmten Abstände eine Abweichung zu den theoretisch berechneten Andockabständen der konstruierten DNA-Origami Strukturen, wobei die Lokalistationsgenauigkeit eine präzisere Abstandsbestimmung erlauben würde. Die Lokalistationsgenauigkeit spiegelt dabei nur die Abweichung der Bestimmung des Masseschwerpunktes der PSF und ist dabei, vereinfacht ausgedrückt, überwiegend abhängig von der Anzahl der eingefangenen Photonen und der Standardabweichung der PSF. Für die Abstandsbestimmung muss aber für diese Methode die Dimension des Andockstranges, mit einer Länge von  $\sim 10$  Basenpaaren ( $\sim 3,4$  nm), ebenso berücksichtigt werden. Somit kann theoretisch die Lokalisation eines rekonstruierten Emitters, neben der Dimension der Lokalisationsgenauigkeit, zusätzlich um diesen Faktor variieren. Daher konnten auch mit dieser Methode keine Origami Konstrukte ab einen Interfluorophorabstand von 6 nm aufgelöst werden. Des Weiteren ist auch hier ersichtlich gewesen, dass vermehrt 2 – 3 Fluoreszenzpunkte diverser Abstände vorhanden waren und eher selten DNA-Origami Konstrukte mit vier Fluoreszenzpunkten zu erkennen waren. Dies spricht wiederum für wenige vollständig 4fach Farbstoff inkorporierte DNA-Origami Konstrukte [91, 92, 93]. Die gute Auflösung der 18 nm und 9 nm DNA-Origami Konstrukte ist darauf zurückzuführen, dass mit dieser Methode, im Vergleich zu den *d*STORM-Aufnahmen, eine höhere Lokalisationsgenauigkeit erzielt werden kann (Abb. 40). Die Zeit, in der Photonen an der Zielstruktur eingefangen werden können, ist hier von der Bindezeit der Farbstoff-gekoppelten Oligonukleotidsequenzen abhängig. Diese Zeit, in der der intakte Farbstoff im Fokus verweilt, ist um den Faktor  $\sim 10$  höher als bei den *d*STORM-Aufnahmen (Tab. 5 und Tab. 6). Demzufolge können im Vergleich zu *d*STORM, bei der die Photonenzahl stark vom photochemischen Verhalten der Emitter abhängig ist, mehr Photonen eingefangen werden, was nach Gleichung

4 zu einer höheren Lokalisationsgenauigkeit führt. Da die Sequenz des Farbstoff-gekoppelten Belichtungsstranges eine Länge von 10 Basen besitzt, was mit den typischen bekannten DNA-Parametern eine Länge von  $\sim 3,4$  nm entspricht, ist dies unter anderem ein Kriterium, der die Auflösung des 6 nm und 3 nm DNA-Origami Konstruktes zusätzlich limitiert. Somit konnten mit dieser Methode DNA-Origami Konstrukte bis zu einem Abstand von maximal 9 nm aufgelöst werden. Darüber hinaus ist in den rekonstruierten Bildern der DNA-Origami Konstrukte zu erkennen, dass mit der DNA-PAINT Methode, aufgrund der Zugabe der Farbstoff-gekoppelten Belichtungsstränge zum Aufnahmebuffer, ein wesentlich höheres Hintergrundsignal vorliegt (Abb. 38). Mit Blick auf das Fluoreszenzverhalten der DNA-PAINT Aufnahmen fällt auf, dass auch hier sowohl die Fluoreszenzintensität, als auch die "Anzeit" bzw. Bindezeit der Farbstoff-gekoppelten Belichtungsstränge für alle DNA-Origami Konstrukte ähnlich ist (Abb. 39 und Tab. 6). Die "Auszeiten" sind dabei für alle DNA-Origami Konstrukte diverser Abstände, im Vergleich zur Referenzstruktur, geringer, unterscheiden sich aber untereinander für die diversen Abstände kaum (Abb. 39 und Tab. 6). Die Anzahl der Bindeereignisse der diversen Abstände liegen hier jeweils höher als beim DNA-Origami Referenzkonstrukt, sind jedoch untereinander relativ ähnlich (Abb. 39 und Tab. 6). Da es hier mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit zu keinen simultanen Bindungsereignissen kommt, ist eine Farbstoffinteraktion eher ausgeschlossen. Somit sollten sich die ermittelten Werte der Auszeit und der Bindungsereignisse der diversen Bindeabstände am DNA-Origami auch nicht unterscheiden bzw. relativ ähnlich sein. Allerdings ist hier auch ersichtlich, dass für die jeweiligen Abstände, überwiegend keine perfekten 4-fach Bindestrang-gekoppelten DNA-Origami Konstrukte vorliegen, sondern, entsprechend dem Histogramm der Auszeit bzw. der Bindeereignisse, lediglich 2 – 3 Bindestränge je DNA-Origami Konstrukt gekoppelt sind. Dieses Ergebnis kann theoretisch auch auf die direkt Cy5 gekoppelte Origami Konstrukte der *d*STORM-Aufnahmen übertragen werden und somit vermutlich ebenfalls davon ausgegangen werden, dass im Durchschnitt nur 2 - 3 Farbstoffe am jeweiligen Konstrukt vorhanden sind und nur wenige "perfekte" 4-fach markierten Origami Konstrukte vorliegen. Theoretisch können aber auch leicht unterschiedliche Inkorporationseffizienzen aufgrund der unterschiedlich gekoppelten Moleküle (Cy5-gekoppelte Oligonukleotidsequenzen für *d*STORM und TCO-gekoppelte Oligonukleotidsequenzen für DNA-PAINT) am Inkorporationsstrang des DNA-Origami Konstruktes vorliegen. Dabei könnten Effekte aufgrund einer niedrigen Kopplungseffizienz der Klick-Chemie (TCO-Tet) theoretisch

ausgeschlossen werden [34, 36, 37, 38]. Dies führt dazu, dass, ebenso wie bei den direkt Cy5-gekoppelten Oligonukleotidsequenzen der DNA-Origami Konstrukten der *d*STORM-Messungen, direkt auf die Inkorporationseffizienz geschlossen werden könnte und die Effizienz der Inkorporation hier wahrscheinlich vergleichbar ist. Aus diesen Ergebnissen des Fluoreszenzverhaltens der DNA-Origami Konstrukte der zwei Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopiemethoden ist dabei ersichtlich, dass unter *d*STORM-Bedingungen abstandsabhängige Fluorophorinteraktionen stattfinden, die das jeweilige Blinkverhalten der Cyaninfarbstoffe in Photoschaltpuffer beeinflussen. Um dieses Phänomen weiter zu analysieren und zu interpretieren, wurden, wie bei den mehrfach markierten Antikörpern, konfokale Fluoreszenztrajekturen aufgenommen und sowohl die Photonenkoinzidenzwerte zum Zeitpunkt  $t = 0$ , als auch die spezifische Fluoreszenzlebenszeit der jeweiligen Konstrukte diverser Interfluorophorabstände bestimmt (Abb. 41). Dabei ist bei den Intensitätstrajektoren ein ähnliches Blinkverhalten festzustellen, wie bei den Trajekturen der Weitfeldaufnahmen (Abb. 37 und Abb. 41). Das Intensitätsniveau ist hier bei den Aufnahmen relativ ähnlich, mit einigen Ausreißern bzw. Intensitätsanstiegen einiger Blinkereignisse der 18 nm, 9 nm und 6 nm DNA-Origami Konstrukte, wobei die Photonenkoinzidenzwerte bei allen Konstrukten niedrig sind, was auf kein simultanes Emittieren zweier Cy5 Farbstoffe hinweist (Abb. 41). Des Weiteren sind die Blinkereignisse der 18 nm, 9 nm und teilweise 6 nm über die gesamte Aufnahmezeit relativ gleich verteilt. Die 3 nm DNA-Origami Konstrukte sind auch hier ein Sonderfall, denn diese zeigen in den konfokalen Trajekturen ebenso wieder ein starkes Blinkverhalten zu Beginn der Messung, gefolgt von nur noch wenigen einzelnen Blinkereignissen während der restlichen Aufnahmezeit (Abb. 41 und Abb. 42). Dies tritt auch teilweise schon bei den 6 nm DNA-Origami Konstrukten, ähnlich wie im Weitfeld, auf (Abb. 42). Diese Phänomene des Blinkverhaltens könnten auf energetischen Farbstoffwechselwirkungen hinweisen, die dabei stark vom Abstand zwischen den Molekülen abhängen. Dies zeigt auch die Analyse der Fluoreszenzlebenszeit der Blinkereignisse der jeweiligen Konstrukte, die mit sinkendem Abstand ebenso abfällt, was ein Indiz für Energieübertragungsprozesse zwischen den Farbstoffen ist (Abb. 41 und Tab. 7). Da die Linkerabstände der direkt gekoppelten Cy5-Oligonukleotidsequenzen laut Hersteller  $\sim 1 - 2$  nm betragen ist der Freiheitsgrad dieser direkt gekoppelten Farbstoffe an den diversen DNA-Origami Konstrukten groß. Theoretisch wäre es also möglich, dass diese Farbstoffe bei einem Interfluorophorabstand von 3 nm ebenso Aggregate wie bei den mehrfach markierten

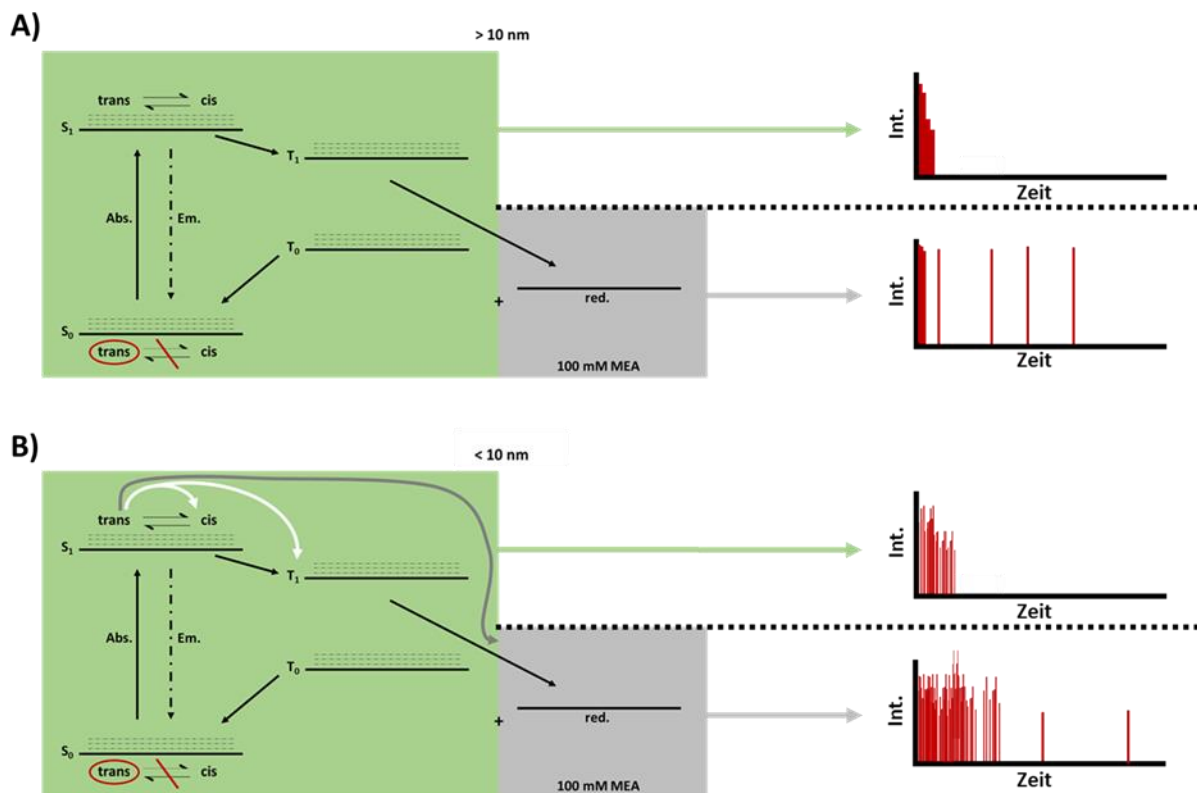
Antikörpern ausbilden könnten, wenn sich diese annähern sollten. Eine Überprüfung mittels Ensemble-Absorptionsmessungen kann mit diesen DNA-Origami Proben allerdings nicht durchgeführt werden, da die Konzentration dieser zu gering für aussagekräftige Daten ist. Dies könnte lediglich durch spektroskopische Messungen eines linearen doppelsträngigen DNA-Systems gleichen Interfluorophorabstandes und gleicher Kopplungsmethode indirekt überprüft werden, da hier die Konzentration dieser kurzen linearen Oligonukleotidsequenzen frei gewählt werden kann. Dieses Fluoreszenzverhalten des schnellen "Flackern" könnte aufgrund von energetischen Fluorophorwechselwirkungen ausgelöst sein, die für diese Proben wiederum charakteristisch für den Abstand der Fluorophore sind. Diese schnellen Blinkereignisse zu Beginn der Messung, auch bei der photoinduzierten Entzerrung dieser schnell fluktuierenden Blinkereignisse, weisen in allen Fällen einen niedrigen Photonenkoinzidenzwert auf, was auf nur einen emittierenden Farbstoff hinweist (Abb. 42). Damit fällt ein besonderes Augenmerk auf den kürzesten DNA-Origami Interfluorophorabstand. Bei diesem Konstrukt wurde die Fluoreszenzlebensdauer über die gesamte Aufnahmezeit der Blinkereignisse bestimmt, sodass für jedes Blinkereignis eine mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebenszeit bestimmt werden konnte (Abb. 43). Dabei ist auffällig, dass die Lebenszeit zu Beginn der Messung, wenn die schnellen Blinkereignisse stattfinden, am niedrigsten ist (Abb. 43). Diese Fluoreszenzlebenszeit steigt mit voranschreitender Messzeit kontinuierlich an und erreicht beim letzten Blinkereignis hier eine Fluoreszenzlebenszeit, die vergleichbar ist mit der Fluoreszenzlebensdauer von nicht interagierenden Farbstoffen der 18 nm bzw. 9 nm DNA-Origami Konstrukte (Abb. 43 und Tab. 7). Demnach kommt es vor allem zu Beginn der Messung, wenn noch alle inkorporierten Fluorophore im 3 nm Abstand intakt waren, zu starken Farbstoffinteraktionen, die die Lebenszeit beeinflussen bzw. erniedrigen. Mit steigender Aufnahmezeit kommt es aufgrund der Anregung bzw. Energieübertragungsprozessen zu Photozerstörungen, sodass hier die Farbstoffinteraktionspartner wegfallen, was sich im Anstieg der Fluoreszenzlebenszeit widerspiegelt (Abb. 43). Auch unter thiofreien Bedingungen ist ein komplexer Fluoreszenzintensitätsverlauf der 3 nm DNA-Origami Konstrukte zu erkennen (Abb. 44). Dieses Verhalten ähnelt dabei stark dem Blinkverhalten dieses Konstruktes unter *d*STORM-Bedingungen. Dabei ist zu erkennen, dass auch hier die Fluoreszenzlebenszeit, vor allem zu Beginn der Messung stark erniedrigt ist (Abb. 44 A). Allerdings ist diese Fluoreszenzlebenszeit bzw. die ausschlaggebende Komponente der Fluoreszenzlebenszeit unter thiolhaltigen

Bedingungen niedriger (Abb. 44B) Des Weiteren ist auch eine weitere Amplitude der korrelierten Intensitätsspur zu erkennen (Abb. 44B). Dies spricht für zusätzliche Interaktionsprozesse zwischen den Farbstoffen dieses DNA-Origami Konstruktes unter *d*STORM-Bedingungen, die zur Fluoreszenzlebensdauererniedrigung beitragen, was unter troloxhaltigen Pufferbedingungen nicht auftritt. Betrachtet man einen freien Cy5 Farbstoff bzw. freien Al647 Farbstoff (der spektroskopisch ähnlich zum Cy5-Farbstoff ist (Abb. 22C)), dann ist unter korrelationspektroskopischen-Bedingungen zu erkennen, dass dieser nur eine weitere Amplitude besitzt (Abb. 24), was auf eine cis-trans Isomerisierung zurückzuführen ist, wobei der cis-Zustand nicht fluoresziert [80]. Im Grundzustand ( $S_0$ ) liegen alle Cy5 Farbstoffe, aufgrund der höheren Energiebarriere im Vergleich zum angeregten Zustand ( $S_n$ ), in einer trans-Isomerisierung vor [80]. Diese cis-trans Isomerisierungen finden vorwiegend im angeregten Zustand ( $S_n$ ) statt und liegt hier in wässriger Umgebung nahezu gleichverteilt vor [80, 96, 97]. Dabei ist bekannt, dass dieser  $S_1$ -cis-Zustand bei einer Wellenlänge von  $\sim 675$  nm, mit einem rel. hohen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), absorbieren kann und eine mittlere Lebenszeit im Bereich von  $\sim 10^{-4}$  s besitzt [98]. Des Weiteren ist es möglich, dass der Cy5 Farbstoff im Laufe der Anregungszyklen in einen Triplett-Zustand ( $T_n$ ) übergeht [16, 46, 82, 83, 98]. Von diesem Zustand ist ebenso bekannt, dass dieser im Bereich von  $\sim 695$  nm absorbieren kann und ebenso eine Lebenszeit von  $\sim 10^{-4}$  s, mit einem niedrigeren Extinktionskoeffizienten als der  $S_1$ -cis-Zustand, besitzt [98]. Andere Publikationen verweisen auf leicht andere Werte dieser  $S_1$ -cis- und  $T_1$ -trans Zustände [96, 97]. Diese Triplett-Übergänge korrelieren dabei mit den Anregungszyklen bzw. der Anregungsleistung [80]. Daher wurden die Korrelationskurven durch den Selbstgleich der jeweiligen konfokalen Trajekturenmessungen bestimmt, da hier an diesem Fluoreszenzlebenszeitmikroskop eine ausreichende Anregungsleistung und Sensitivität der Detektoren gewährleistet werden konnte. Die Absorptionswellenlänge des  $S_1$ -cis Zustandes und des  $T_1$ -trans Zustandes überlappen dabei sehr gut mit dem Emissionsspektrum eines  $S_1$ -trans Cy5 Farbstoffes [98]. Daher ist es durch die gute spektrale Überlappung möglich, dass hier Energieübertragungen via Resonanzenergieübertragung effizient stattfinden, die dabei die Fluoreszenzlebenszeit des  $S_1$ -trans Cy5 beeinflussen können. Da der  $S_1$ -cis- und  $T_1$ -trans Zustand eine rel. ähnliche Lebenszeit besitzen, sind diese in den Korrelationskurven schwierig zu unterscheiden, aber Bestandteil der Amplitude der korrelierten 3 nm DNA-Origami Kurve unter thiofreien Bedingungen (Abb. 44B). Unter Photoschaltbedingungen können diese Energieübertragungsprozesse auch auftreten (Abb.



44B). Allerdings kommt es unter diesen thiolhaltigen Bedingungen zu Reaktionen mit dem  $T_1$ -Zustand und zur Überführung dieses  $T_1$ -Cy5 Farbstoffes in einen reduzierten Zustand bzw. in einen stabilen Auszustand [16, 46, 82, 83, 98]. Darüber hinaus ist bekannt, dass dieser stabile Auszustand ein relativ breites Absorptionsspektrum besitzt, das bei  $\sim 311$  nm ein Maximum aufweist [98]. Dieser Auszustand absorbiert allerdings auch zu einem geringen Teil bei einer Wellenlänge von  $\sim 647$  nm und damit am Absorptionsmaximum des sich im Grundzustand befindlichen Cy5-Farbstoffes [98]. Demnach können einerseits Cy5 Farbstoffe im Auszustand theoretisch auch mit dem Anregungslicht angeregt bzw. in den Grundzustand ( $S_0$ ) überführt werden. Andererseits können diese Farbstoffe im Auszustand auch von einem Cy5 im  $S_1$ -trans Zustand via Resonanzenergietransfer angeregt und in den  $S_0$ -Zustand überführt werden. Da sich die Absorption dieses Auszustandes über einen großen Bereich erstreckt und nur zu einem geringen Teil beim Absorptionsmaximum des  $S_0$ -Cy5 absorbiert, müsste die Effizienz der Energieübertragung auf den Auszustand gering, aber dennoch ausreichend für kurze Interfluorophorabstände sein [98]. Diese Photoaktivierung könnte sowohl zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des  $S_1$ -trans Zustandes, als auch zu einer Verkürzung der Lebenszeit des Auszustandes führen. Dieser Energieübertragungsprozess könnte die zusätzliche Amplitude der korrelierten Kurve, die zusätzliche starke Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit und die schnell fluktuierenden Intensitätsverläufe zu Beginn der Messung kurzer Interfluorophorabstände unter *d*STORM-Bedingungen erklären (Abb. 44). Dies würde aber die Wahrscheinlichkeit der Farbstoffe im Anzustand ( $S_n$ ) erhöhen, wobei dabei auch die Wahrscheinlichkeit höherer Photonenkoinzidenzwerte steigt, da diese Farbstoffe wiederum weitere Farbstoffe im Auszustand anregen könnten. Alle analysierten Daten unter *d*STORM-Bedingungen zeigten allerdings niedrige Photonenkoinzidenzwerte und damit keine simultan aktiven Cy5 Farbstoffe. Wenn mehrere Farbstoffe im  $S_1$ -Zustand verweilen würden, könnte theoretisch Singlet-Singlet Annihilation oder Energie-Hopping (homo-FRET) stattfinden. Dies würde aber die Fluoreszenzlebenszeit nicht beeinflussen. Die zuvor erwähnten Energieübertragungsprozesse von  $S_1$ -trans auf  $S_1$ -cis oder  $T_1$ -trans könnten allerdings die Fluoreszenzlebenszeit beeinflussen und ebenso zusätzlich zu einem schnellen Blinken der Farbstoffe beitragen. Die Effizienz dieser Prozesse ist dabei, ähnlich wie bei Dipol-Dipol induzierten FRET-Ergebnissen, stark von der Distanz zwischen den beteiligten Fluorophoren abhängig ( $\sim R^6$ ) [42, 94]. Ein zusammenfassender schematischer Überblick möglicher abstandsabhängiger Energieübertragungsprozesse der 4-fach markierten DNA-

Origami Konstrukte, die bei Fluorophorabständen unter 10 nm auftreten und die gezeigten Charakteristika in den Intensitätstrajektoren der Emitter erklären könnten, ist in Abbildung 50 dargestellt.



**Abbildung 50: Schematische Darstellung abstandsabhängiger Energietransferprozesse von Cyaninfarbstoffen in Puffern mit und ohne Thiolzusätze.** Darstellung des Fluoreszenzverhaltens, der Energieniveaus und der Energieübertragungsprozesse der 4 Cy5 Emitter am hybridisierten DNA-Origami mit Interfluorophorabständen von A) über 10 bzw. B) unter 10 nm, sowohl ohne (grün hinterlegt), als auch unter Photoschaltbedingungen (grün + grau hinterlegt). A) Bei Fluorophorabständen über 10 nm kommt es zu keiner Interaktion der Farbstoffe, was zum charakteristischen Blinkverhalten (rote Linien im Intensitätstrajektor) der Cy5 Emitter unter *d*STORM-Bedingungen (grauer Pfeil) und zu einem schnellen Photobleichen der Farbstoffe (rote Bleichschritte im Intensitätstrajektor) ohne thiolhaltigen Pufferbedingungen (grüner Pfeil). B) Bei Fluorophorabständen unter 10 nm kommt es je nach Interfluorophorabständen zu Effizienten Farbstoffinteraktionen, was zu einem charakteristischen abstandsabhängigen Blinkverhalten (rote Linien im Intensitätstrajektor) der Cy5 Emitter unter *d*STORM-Bedingungen (grauer Pfeil) und ohne thiolhaltigen Pufferbedingungen (grüner Pfeil) führt, wobei unter Photoschaltbedingungen (grau + grün hinterlegt) neben den  $S_1$ -trans auf  $S_1$ -cis /  $T_1$ -trans Energietransferprozessen (weiße Pfeile, Energietransfereffizienz je nach Interfluorophorabstand), die auch ohne thiolhaltigen Puffern hier auftreten, zusätzlich Photoaktivierungsprozesse (grauer Pfeil in grüner Box) durch Energieübertragung von  $S_1$ -trans auf den reduzierten Farbstoff im Auszustand auftreten, was sich im Blinkverhalten (rote Linien im Intensitätstrajektor) unter *d*STORM-Bedingungen (grauer Pfeil) bemerkbar macht.

Da in diesen Konstrukten bis zu 4 Farbstoffe an einem DNA-Origami vorhanden sind, ist die Distanzabhängigkeit der Energieübertragung für diese Systeme weitaus komplexer [95]. Die Effizienz dieser Energieübertragung bzw. dieser Photoaktivierung sollte dabei bei jedem Photozerstörungsereignis eines Fluorophores abnehmen und sich damit im Laufe der Aufnahmezeit stetig verringern. Dies ist auch in der zeitlichen Analyse der

Fluoreszenzlebenszeitveränderung in den Intensitätstrajektoren der konfokalen Messungen zu beobachten (Abb. 43 und Abb. 44). Die Distanzabhängigkeit konnte dabei auch aus den Werten der Auszeit der *d*STORM-Aufnahmen im Weitfeld und aus den biexponentiellen Fluoreszenzlebenszeitkomponenten gezeigt werden. Hierbei steigt die Photoaktivierungsrate, ebenso wie die Resonanzenergieübertragungseffizienz für sinkende Interfluorophorabstände an (Abb. 45). Die Effizienz der Energieübertragung der 3 nm DNA-Origami Konstrukte lässt sich durch die gute spektrale Überlappung der beteiligten Energiezustände ( $S_1$ -cis/trans,  $T_1$ ) bei diesen Abständen theoretisch eine höhere Effizienz erwarten (Abb. 45B). Dabei ist davon auszugehen, dass durch die nicht perfekte Inkorporation der Cy5-gekoppelte Oligonukleotidstränge, hier nicht nur 4fach gekoppelte DNA-Origami Strukturen mit einem Interfluorophorabstand von 3 nm analysiert wurden, was sich wiederum auf die sensitive Fluoreszenzlebenszeitbestimmungen auswirkt und hier wahrscheinlich für niedrigere berechnete Energieübertragungseffizienzen sorgt. Aus den Daten der Energietransfereffizienz der DNA-Origami Konstrukte diverser Interfluorophorabstände unter *d*STORM-Bedingungen (Abb. 45 B) lässt sich aber darauf schließen, dass der FÖRSTER-Radius ( $R_0$ ), bei dem die Effizienz der Energieübertragung  $\sim 50\%$  beträgt, ungefähr bei 5 – 6 nm liegen müsste. Dennoch ist festzuhalten, dass diese Energieübertragungseffizienz eine Mischung mehrerer energetischer Transferprozesse ist. Aus den gezeigten Daten und erwähnten Mechanismen ist klar ersichtlich, dass mit dieser Mess- und Analysemethode unter *d*STORM-Bedingungen spezifische Aussagen über die Distanz der beteiligten Farbstoffe im sub-10 nm Raum getroffen werden können. Dennoch ist zu erwähnen, dass spezifische Energie-Annihilationsprozesse, wie beispielsweise Energie-Hopping bzw. homo-FRET, diese Analyse erschweren könnte [29, 87]. Um die Methode anzuwenden und für mögliche zu analysierende Zielstrukturen zu testen, wurden als biologisches Beispiel zwei multimerische Rezeptoren ausgewählt. Hierbei handelte es sich um den hetero-pentamerischen GABA-A Rezeptor (engl.: hetero-pentameric  $\gamma$ -aminobutyric acid type A), sowie den tetramerischen Kainate-Rezeptor GluK2 [99, 100]. Da diese Methode auf die Analyse abstandsabhängiger Photoschalteffekte abzielt, muss der Farbstoff möglichst genau und mit einem geringen Abstand zur Zielstruktur bzw. zum Zielpunkt an der jeweiligen Struktur gekoppelt werden. Eine mögliche Strategie dieses Problem zu umgehen ist ein direktes gruppenspezifisches kovalentes Koppeln von organischen Farbstoffen an Zielproteine, was mithilfe einer Erweiterung des genetischen Codes über die Einbringung unnatürlicher Aminosäuren (uAA) in das Zielprotein verwirklicht werden kann.

Diese können über bioorthogonale Klick-Chemie effizient und spezifisch mit kleinen organischen Farbstoffen gekoppelt werden [101, 102]. Daneben zeigen neueste Studien und Analysen, dass mit dieser Kopplungsmethode mögliche Zielproteine spezifisch und effizient mit einem geringen Abstandsfehler von  $\sim 1$  nm markiert werden können und darüber hinaus auch sterisch schwer zugängliche Stellen an Proteinen spezifisch gekoppelt werden können [34, 103, 104]. Aus diesen Gründen wurden mithilfe dieser Kopplungsmethode die zuvor erwähnten Rezeptoren mit H-Tet-Cy5 Farbstoffen spezifisch markiert. Die Positionen der eingebauten modifizierten unnatürlichen Aminosäuren wurden dabei von Alexander Kuhleemann am Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg ausgewählt und die jeweiligen Rezeptoren modifiziert. Dabei wurde durch das Einbringen von einem bzw. mehreren TCO-modifizierten nicht kanonischen Aminosäuren (TCO-L-Lysin) in der extrazellulären Domäne der monomerischen  $\gamma_2$ -Untereinheit (1x TCO-L-Lysin), der dimerischen  $\alpha_2$ -Untereinheit (2x TCO-L-Lysin) der GABA-A Rezeptors und des homo- tetramerischen GluK2 Rezeptors (4x TCO-L-Lysin) die jeweiligen Rezeptoren modifiziert und in HEK293T Zellen exprimiert. Die Abstände der Farbstoffe wurden dabei mithilfe der Visualisierungssoftware Pymol berechnet. Diese betragen hierbei für den an den  $\alpha_2$ -Untereinheiten zweifach markierten GABA-A Rezeptor  $\sim 5$  nm. Beim tetramerischen GluK2-Rezeptor variierten die Abstände zwischen  $\sim 2,1$  nm -  $\sim 11,9$  nm. Die jeweiligen dSTORM-Aufnahmen zeigten dahingegen keine ersichtlichen Unterschiede in den rekonstruierten Bildern, sodass hier weder der Abstand zwischen den Farbstoffen aufgelöst werden konnte, noch die unterschiedliche Stöchiometrie der Rezeptoren, beispielsweise durch unterschiedlich große rekonstruierte Fluoreszenzpunkte, zu erkennen war (Abb. 46). Die statistische Auswertung des photophysikalischen Blinkverhaltens der Rezeptoren zeigte allerdings, dass die mehrfach markierten Rezeptoren, im Vergleich zur Referenz der einfach gekoppelten  $\gamma_2$ -Untereinheit des GABA-A Rezeptors, eine unterschiedlich verkürzte Auszeit und eine unterschiedliche Erhöhung der Detektionsereignisse besaßen (Abb. 46 und Tab. 8). Dabei verdoppelte sich die Anzahl der Blinkereignisse des zweifach markierten GABA-A Rezeptors und diese vervierfachte sich für die tetramerisch markierten GluK2 Rezeptoren (Abb. 46 und Tab. 8). Des Weiteren zeigten die Auszeiten zwischen den Blinkereignissen ein ähnliches Verhalten, wobei hier die Auszeit der doppelt markierten GABA-A Rezeptoren, im Vergleich zur Referenz des monomerisch markierten GABA-A Rezeptors, halbiert wurden und die tetramerisch markierte Probe hier eine dreifach reduzierter Auszeit zeigte (Abb. 46 und

Tab. 8). Hierbei kann über die Anzahl der Detektionsereignisse auf die Stöchiometrie der Rezeptoren im sub-10 nm Bereich geschlossen werden, da die analysierten Werte hier im Verhältnis ziemlich gut die Anzahl der gekoppelten Farbstoffe widerspiegeln. Dabei korreliert die Anzahl der gekoppelten Fluorophore bei den Rezeptormessungen wesentlich besser mit der Anzahl der Detektionsereignisse als bei den DNA-Origami Messungen unter *d*STORM-Bedingungen im Weitfeld (Abb. 36 und Abb. 46). Dies könnte einerseits, wie zuvor erwähnt, daran liegen, dass teilweise nicht alle gekoppelten Cy5 Oligonukleotidstränge in die jeweiligen DNA-Origami Strukturen eingebaut wurden und andererseits in den biologischen Proben der Rezeptoren durch die zahlreiche zelluläre Kontrollmechanismen gewährleistet wird, dass nur intakte und korrekte Proteinstrukturen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Des Weiteren weisen diese Daten auch darauf hin, dass der spezifische Einbau der unnatürlichen Aminosäuren (TCO-L-Lysin) und die bioorthogonale Klick-Reaktion mit Tetrazin-modifizierten Farbstoffen sehr effizient ist. Die direkte Analyse der jeweiligen Auszeiten der Rezeptordaten und die damit verbundene Überführung in spezifische Distanzaussagen gestaltet sich hier allerdings komplex, da die Distanzabhängigkeit des Blinkverhaltens hier nicht nur von den Energieübertragungsprozessen abhängig ist, sondern auch von der Anzahl der gekoppelten Farbstoffe. Daher könnte hier die mittlere Distanz des tetramerisch markierten GluK2 Rezeptors durch den Abgleich des Blinkverhaltens der Emitter mit den jeweiligen DNA-Origami Konstrukten analysiert werden und diese DNA-Origami Strukturen, da sie ebenso viele Farbstoffe tragen, als Referenz- bzw. Kalibrierungsmessungen genutzt werden. Da Proteine und Oligonukleotide für eine veränderte Mikroumgebung des Farbstoffes sorgen, könnten hier Effekte durch Wechselwirkungen des jeweiligen Farbstoffes mit den jeweiligen Aminosäuren bzw. Nukleotiden auftreten, die das photophysikalische Verhalten des Farbstoffes leicht ändern. Daher könnten die jeweiligen Referenzproben miteinander korreliert und ein Korrekturfaktor ermittelt werden, sodass die multimerisch gekoppelte GluK2 Rezeptorprobe um diesen Faktor korrigiert werden können. Allerdings ist zu erwähnen, dass diese Methode der Analyse des photophysikalischen Fingerabdrucks der abstandsabhängigen Blinkverhalten im Weitfeld fehlerbehaftet ist, da hier die Probe, aufgrund der Dichte der Rezeptoren, zuerst mit einer gewissen Anregungsleistung belichtet werden muss, bis ein Gleichgewicht aus Fluorophoren im An- und Auszustand bzw. ein adäquates Blinkverhalten eingestellt ist. Dabei könnten allerdings, vor allem bei Interfluorophordistanzen  $< 5$  nm, die ein schnelles abstandsabhängiges Blinkverhalten zu

---

Beginn zeigen, einige Fluorophore photozerstört werden bevor die Messung beginnt, was wiederum zu Fehlanalysen und Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse führt. Des Weiteren können auch leichte Unterschiede des Belichtungswinkels im Weitfeld, vor allem bei zellulären Aufnahmen, die zumeist im TIRF-Belichtungsmodus aufgenommen werden, zu unterschiedlichen Photoschaltraten der Emitter führen, was ebenso zu schwierig interpretierbaren Ergebnissen führt. Daher würden hier zeitaufgelöste konfokale *d*STORM-Messungen aufgrund der Sensitivität und schonenden Belichtung der Probe vor der Messung priorisiert werden bzw. den Vorzug erhalten. Ebenso kann hierdurch das schnelle abstandsabhängige Blinkverhalten sensitiver, mit einer hohen zeitlichen Auflösung, analysiert werden, was zu aussagekräftigeren Analysen im sub-10 nm Raum führt. Des Weiteren würde hierbei eine zusätzliche Analyse der Fluoreszenzlebenszeit eine spezifischere Abstandsbewertung gewährleisten. Darüber hinaus könnte auch versucht werden das Expressionslevel der zu analysierenden Rezeptoren, für Weitfeldaufnahmen, zu reduzieren, um einerseits die Belichtungszeit zu Beginn der Messung zu minimieren und andererseits mögliche Fehlanalysen aufgrund der Emitterdichte auszuschließen. Denn die Analyse des Blinkverhaltens ist stark vom jeweiligen Algorithmus zur zeitlichen Verfolgung des Emitterverhaltens abhängig. Bei der hier genutzte Kalman Filterung, zur räumlichen und zeitlichen Verknüpfung von zusammengehörigen Lokalisationen eines Emitters, wird ein gewisser Abstandsradius eingestellt, dessen Dimension sich aus der eingestellten Lokalisierungsunsicherheit und dem eingestellten Distanzschwellenwert errechnet [45]. Dieser Radius konvergiert über die Zeit und bleibt damit nicht konstant [45]. Somit ist dieser Filter zur räumlichen und zeitlichen Verknüpfung zusammengehöriger Lokalisationen eines Emitters gegenüber möglichen Einflüssen und Ungenauigkeiten der Dichte der Emitter robuster als andere Algorithmen, deren Abstandsradius teilweise auf einen eingestellten Wert festgehalten wird [105].

Als eine geeignete Kooplungsmethode, die in einen geringen Abstandsfehler zur Zielstruktur resultiert, bietet sich die effiziente und spezifische Klick-Chemie für die Präparation von Zielstrukturen an. Da das Expressionslevel nicht exakt kontrolliert werden kann, könnten solche Proben auch als Einzelmoleküloberflächen aus immobilisierten, isolierten und aufgereinigten Rezeptoren vermessen werden. Des Weiteren könnten die Weitfeld *d*STORM-Aufnahmen nochmals mit einer anderen Auswerteroutine analysiert werden, um das abstandsabhängige Blinkverhalten auch hier wesentlich robuster und ersichtlicher

---

auszuwerten. Dies könnte beispielsweise durch zeitliche Kriterien des Blinkverhalten analysiert werden, indem darauf geachtet wird ab wann ein gewisser Prozentanteil der totalen Blinkereignisse eines Emitters bzw. eines gekoppelten Origami erreicht sind. Dies resultiert aus dem Hintergrund, da hier Interfluorophorabstände von 3 nm bzw. auch teilweise 6 nm ein schnelles Blinkverhalten zu Beginn der Messung zeigten und nach der Photozerstörung einiger Farbstoffe nur noch vereinzelt blinkten, während höhere Interfluorophorabstände ein homogenes Blinkverhalten über die gesamte Aufnahmezeit zeigten. Dieses schnelle Blinkverhalten konnte in den Weitfeldaufnahmen zwar teilweise nicht erfasst werden, dennoch müsste ein zeitlicher Abgleich der Blinkspuren der diversen Interfluorophorabstände gewisse Abstandsinformationen beinhalten. Des Weiteren müsste auch die effiziente Klick-Chemie an den DNA-Origami Konstrukten mit Tet-modifizierten Cy5 Farbstoffen getestet werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass aufgrund der kleineren neutraleren TCO-Modifikation der Oligonukleotidsequenzen, eine höhere Inkorporationseffizienz erzielt werden kann. Des Weiteren könnte ein so gekoppeltes DNA-Origami eventuell auch mit den Rezeptordaten vergleichbarer sein, da hier dann die selbe Kopplungsmethode verwendet wurde und mögliche Effekte der TCO-Tet Kopplung ausgeschlossen werden könnten. Darüber hinaus könnten in Folgeexperimenten auch die Abstandsabhängigkeit in kleineren Abstandsschritten genauer analysiert werden und eventuell ein molekulares Lineal aus Cy5 gekoppelten Oligonukleotid-Doppelsträngen erstellt werden.

Die hier präsentierte Methode zur Analyse des abstandsabhängigen Fingerabdruckes des Blinkverhaltens von Cyaninfarbstoffen unter *d*STORM-Bedingungen, womit Farbstoffabstände und Stöchiometrien im sub-10 nm Bereich erschlossen werden können, ist dabei nicht nur auf diese Farbstoffklasse beschränkt. Auch andere Farbstoffklassen wie Rhodamine und Oxazine können ein Blinkverhalten zeigen bzw. in einen Auszustand übergehen, der ebenso wie bei Cyanine, im kürzeren Wellenlängenbereich absorbieren und damit auch photoaktiviert werden kann [83]. Damit könnten auch diese Farbstoffklassen für die Analyse des abstandsabhängigen Fingerabdruckes des Blinkverhaltens genutzt werden, was diese Methode nicht nur auf den roten Spektralbereich der Farbstoffe beschränken würde.

## 5.4 Fluoreszenzlöschung von Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Seibel am Lehrstuhl für organische und biologische Chemie der organischen Chemie der Julius-Maximilians Universität Würzburg synthetisierte erfolgreich vier Dendronstrukturen, die terminal mit Cyaninfarbstoffen gekoppelt sind und im Zentrum ein Tetrazin als reaktive Gruppe tragen. Die vier Dendronstrukturen besitzen aufgrund verschiedener Längen der Kohlenwasserstoffketten unterschiedliche Interfluorophorabstände. Die gekoppelten Cyaninfarbstoffe tragen jeweils drei Sulfonsäurereste (Abb. 12) und unterscheiden sich diesbezüglich leicht von den Cyaninfarbstoffen Al647 und Cy5, die vier bzw. zwei dieser Seitengruppen besitzen. Somit kann sich die Löslichkeit der Dendron-gekoppelten Cyaninfarbstoffe leicht von der Löslichkeit der Cyaninfarbstoffe Al647 bzw. Cy5 unterscheiden. Spektroskopisch sind die Cyaninfarbstoffe Al647 und Cy5 nahezu identisch (Abb. 22 C). Hierdurch kann davon ausgegangen werden, dass sich die spektroskopische Eigenschaft der Dendron-gekoppelten Cyaninfarbstoffe, die drei Sulfonsäurereste tragen, ebenso nicht unterscheiden. Daher kann als Referenzfarbstoff dieser Dendronstrukturen Al647 oder Cy5 verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der Cyaninfarbstoff Cy5 als Kontrolle genutzt. Die unterschiedlichen Löslichkeiten der Farbstoffe und deren Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum wurde bereits bei den Analysen mehrfach gekoppelter Antikörper aufgezeigt (Abb. 22 A und Abb. 22 B). Da die Dendronstrukturen jeweils drei Cyaninfarbstoffe tragen, besteht die Möglichkeit, dass diese Strukturen ein höheres Emissionsignal zeigen als ein einzelner Cyaninfarbstoff. Ein solches Verhalten kann für die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie vorteilhaft genutzt werden, da ein höheres Fluoreszenzsignal die Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Emitter erhöht und somit die Auflösung positiv beeinflusst. Ensemble Analysen der Dendronstrukturen zeigten allerdings ein komplexes spektroskopisches Verhalten. Dabei ist literaturbekannt, dass Tetrazin gekoppelte Farbstoffe eine Fluoreszenzlöschung zeigen können [34]. Diese Fluoreszenzlöschung kann durch Abreaktion bzw. Kopplung des Tet-Farbstoffes an TCO gekoppelten Molekülen bzw. Zielstrukturen eliminiert werden. [34]. Dies ist auch in den Ergebnissen der Dendronstrukturen zu erkennen (Abb. 48 A). Hierbei ist die Entfernung des Tetrazin zum Farbstoff ein entscheidendes Kriterium für das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung (Abb. 48 A). So zeigt der freie Me-Tet-Cy5 Farbstoff den höchsten Anstieg der Fluoreszenzintensität nach TCO-Kopplung und damit die stärkste Fluoreszenzlöschung vor der Abreaktion mit TCO\*-Lysin. Nach strukturellen Angaben des Herstellers ist das Tetrazin-



Molekül über eine kurze Kohlenwasserstoffkette mit dem Cy5-Farbstoff gekoppelt, dessen Länge  $\sim 1$  nm beträgt und frei rotieren kann. Der verwendete Me-Tet-Cy5 weist hiermit, unter den analysierten Molekülen, den kürzesten Abstand zwischen Tetrazin und Farbstoffmolekül auf. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach TCO Reaktion liegt dabei für alle Dendronstrukturen weit unterhalb des Anstieges des Referenzfarbstoffes. Dies spiegelt die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung durch Tetrazin von den Abständen zum Farbstoff wieder. Die Dendronstrukturen weisen ein ähnliches Grundgerüst auf und unterscheiden sich hauptsächlich in der Länge der Kohlenwasserstoffketten (C3 – C17) zwischen Farbstoff und Verzweigungspunkt des Dendrons (Abb. 12). Mit zunehmender Kohlenwasserstoffkette nimmt hierbei auch der Einfluss durch Tetrazin auf die Fluoreszenzfähigkeit der Farbstoffe ab (Abb. 48 A).

Die abreagierten Dendronstrukturen zeigen eine ausgeprägtes Dimerschulter aus H-Aggregaten. Die Bildung dieser H-Dimere ist hierbei nicht durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Dendronstrukturen, sondern durch Farbstoffinteraktionen eines Dendrons ausgelöst (Abb. 48 C). Während die Höhe der Dimerschulter in PBS mit steigender Kohlenwasserstoffkettenlänge und damit auch mit steigendem Interfluorophorabstand reduziert wird, ist das Absorptionsverhalten der H-Dimere in ddH<sub>2</sub>O vergleichbar hoch. Durch die Bildung von H-Aggregaten ist die Emission der dreifach markierten Dendronstrukturen drastisch erniedrigt (Abb. 49 A). Auch bei dem größten Interfluorophorabstand der Dendronstruktur C17N zeigt sich eine ausgeprägte H-Dimer Absorption und ein stark verringertes Emissionsverhalten in ddH<sub>2</sub>O. Durch Zugabe von EtOH können H-Dimere in allen Dendronstrukturen destabilisiert und stark reduziert werden (Abb. 49 A). Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, die allerdings für alle Dendronstrukturen dennoch weit unterhalb der Emissionsintensität eines einzelnen freien Cy5 Farbstoffes in ddH<sub>2</sub>O liegt (Abb. 49 A). Die Reduktion der H-Dimerschulter durch Zugabe von EtOH ist dabei auf die erhöhte Löslichkeit der Farbstoffe zurückzuführen, sodass diese H-Dimere aufgelöst werden (Abb. 49 A).

In allen Messungen mit EtOH-Zugabe führt eine Erhöhung der organischen Lösungsmittelkonzentration zu einer bathochromen Verschiebung der Spektren, was auf eine unterschiedliche lösungsmittelabhängige Solvation der Energiezustände ( $S_n$ ) zurückzuführen ist [10]. Der Einfluss der H-Dimere auf das Fluoreszenzverhalten der

Dendronstrukturen ist auch in der Analyse der Fluoreszenzlebenszeit zu erkennen (Abb. 49 C). Hierbei bewirkt eine Destabilisierung der H-Dimere durch EtOH einen Anstieg der Fluoreszenzlebenszeit (Abb. 49 C und Tab. 9). Dennoch ist die Anpassung der Abklingkurven der Dendronstrukturen komplex und besteht aus mehreren Fluoreszenzlebenszeitkomponenten (Tab. 9). Da die H-Dimerschulter durch Zugabe von EtOH weitestgehend reduziert werden kann, ist dieses komplexe Verhalten auf Energieübertragungsprozessen zwischen den Farbstoffen zurückzuführen, was sich in dem komplexen Verhalten der Fluoreszenzlebenszeit und der reduzierten Emissionsintensität widerspiegelt (Abb. 49 A und Abb. 49 C). Somit zeigt sich in den spektroskopischen Analysen keine höhere Emissionsintensität aufgrund einer Vielzahl unabhängig fluoreszierender Farbstoffen, sondern eine starke Verringerung des Fluoreszenzsignals durch starke und schwache Farbstoffinteraktionen. Dieses Verhalten ähnelt dabei stark dem spektroskopischen Verhalten mehrfach markierter Antikörper. Darüber hinaus zeigt sich auch nach Reduktion von H-Dimeren eine Beeinträchtigung des Fluoreszenzverhalten durch Farbstoffwechselwirkungen bzw. Energieübertragungsprozessen. Die bei den DNA-Origami Strukturen analysierten Energieübertragungsprozesse sind dabei auch hier übertragbar. Demzufolge kann durch die Analysen der mehrfach markierten Antikörper und DNA-Origami Strukturen davon ausgegangen werden, dass diese Dendronstrukturen unter *d*STORM-Bedingungen ein ähnliches Verhalten zeigen, wobei im Mittel nur einer der Farbstoffe aktiv ist. Diese Energieübertragungsprozesse konkurrieren dabei mit dem Modell eines Cyanin-basierten Superemitters, der die Energie gebündelt in Form von Fluoreszenz abgeben soll. Dennoch bleibt weiterhin zu testen, wie sich diese Dendronstrukturen unter MEA-haltigen Bedingungen verhalten bzw. sich das photophysikalische Verhalten auf die jeweiligen Intensitätstrajektoren der Interfluorophorabstände unter konfokalen Bedingungen auswirken. Anders als bei dem definierten System der DNA-Origami Strukturen, die eine Vielzahl an Subpopulationen unterschiedlicher Cy5 inkorporierter Konstrukte aufwiesen, können diese Dendronstrukturen mit beliebigen Interfluorophorabständen chemisch effizient synthetisiert werden. Dies erleichtert ebenso die Interpretation der gemessenen Daten und könnte darüber hinaus zur genauen robusten Analyse anstandsabhängiger Energieübertragungsprozesse unter *d*STORM-Bedingungen genutzt werden.

---

## 6 Fazit

In dieser Arbeit wurden die in der Lokalisationsmikroskopiemethode *d*STORM häufig genutzten Cyaninfarbstoffe Cy5 bzw. Alexa Fluor 647 im Hinblick auf ihr chemisches und photophysikalisches Verhalten unter diversen Pufferbedingungen genauer analysiert. Dabei konnte durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin J. Schnermann am “Chemical Biology Laboratory” des “National Cancer Institute” in Frederick (USA), sowie Prof. Dr. Alexander Greer am Lehrstuhl für Chemie des Brooklyn College der “City University of New York” in Brooklyn aufgezeigt werden, dass Cyaninfarbstoffe, ähnlich zu anderen Farbstoffklassen, einen chemischen Mechanismus unterlaufen, der zu strukturellen Veränderung des Farbstoffes und dessen spektroskopischen Eigenschaften führt. Es konnte aufgeschlüsselt werden, dass dieser neuartige Mechanismus zur Zerschneidung des Doppelbindungssystems der Cyaninfarbstoffe führt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Singulett-Sauerstoff ausschlaggebend für diesen Prozess ist, der das konjugierte-Doppelbindungssystem angreift, was zur Verkürzung dessen um zwei Kohlenstoffatome führt. Des Weiteren konnte aufgeklärt werden, dass dieser chemische Mechanismus durch intrinsische Umlagerungen abläuft. Somit kann Cy7 zu Cy5 chemisch verkürzt werden und dieser, um zwei Kohlenstoffe verkürzte Cyaninfarbstoff, weiter zu Cy3 umgewandelt werden. Darüber hinaus konnte einerseits gezeigt werden, dass dieser Mechanismus mit relativ einfachen Pufferzusätzen verhindert bzw. unterdrückt werden kann. In Zusammenarbeit mit Mara Meub vom Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg konnte dargelegt werden, dass dieser Mechanismus der Photozerschneidung von Cyaninfarbstoffen auch vorteilhaft für die Lokalisationsmikroskopie genutzt werden kann und hiermit die Aufnahmezeit von DNA-PAINT basierten Methoden deutlich reduziert werden kann. Diesbezüglich konnten einige Optimierungsmöglichkeiten aufgezeigt werden, die das Potenzial dieser Methode weiter steigern könnten. Im Hinblick auf das Blinkverhalten des Cyaninfarbstoffes Cy5 unter *d*STORM-Bedingungen konnte gezeigt werden, dass qualitativ hochwertige Aufnahmen und Rekonstruktionen unabhängig vom Farbstoffkopplungsgrad der Antikörper sind, da im Mittel die Farbstoffe durch Energieübertragungsprozesse auch bei höheren Kopplungsgraden vereinzelt im Anzustand verweilen. Lediglich die Wahrscheinlichkeit der Blockierung der spezifischen Bindeepitope der Antikörper steigt mit höheren Kopplungsgraden, was zu unspezifischen Bindeereignissen und einem erhöhten Hintergrundsignal führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Cyaninfarbstoffe

---

Alexa Fluor 647 und Cy5 bei höheren Kopplungsgraden, abhängig von der Wasserlöslichkeit des Farbstoffes, H-Dimere unterschiedlich stark ausbilden können, die die Emissionsintensität beeinflussen. Unter *d*STORM-Bedingungen werden diese starken Farbstoffwechselwirkungen, durch ein Verlagern des Monomer-Dimer Gleichgewichts bzw. das Überführen der monomeren Farbstoffe in einen Auszustand, weitestgehend destabilisiert. Durch komplexe Energieübertragungsprozesse höherer Kopplungsgrade, ausgelöst durch starke und schwache Farbstoffwechselwirkungen, konnte gezeigt werden, dass sich die spezifische Fluoreszenzlebenszeit, abhängig vom Kopplungsgrad, unterscheidet. Dies konnte genutzt werden um verschiedene immunomarkierte zelluläre Strukturen, durch Analysen der Fluoreszenzlebenszeit, zu separieren. Hierbei bot sich der Vorteil, dass diese Aufnahmen frei von chromatischer Abberation aufgenommen werden konnten und darüber hinaus nur eine Anregungswellenlänge genutzt werden kann. Unter thiolhaltigen Pufferbedingungen zeigte sich allerdings, dass höhere Kopplungsgrade charakteristische komplexe Blinkverhalten zu Beginn der Messung aufweisen. Diese konnten hierbei aber nicht genauer entschlüsselt werden, da die Interfluorophorabstände am Antikörper diffus und nicht genau bestimmt sind. Mit definierten Systemen auf Basis von DNA-Origami Konstrukten und damit verbunden exakt festgelegten Interfluorophorabständen, konnten diese charakteristischen photophysikalischen Phänomene hingegen genauer analysiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass das charakteristische Blinkverhalten unter Photoschaltbedingungen, aufgrund distanzabhängiger Energieübertragungseffizienzen, genutzt werden kann, um Aussagen über Interfluorophorabstände im sub-10 nm Raum treffen bzw. analysieren zu können. Dabei zeigte sich, dass unter thiolhaltigen Pufferbedingungen, neben  $S_1$ -trans-cis oder  $S_1$ -trans- $T_1$  Energieübertragungen, vor allem die Photoaktivierungsrate bzw. -effizienz ausschlaggebend ist. Hierdurch können vor allem unter konfokalen Bedingungen in Photoschaltpuffer, aufgrund spezifischer Analysen der jeweiligen Intensitätstrajektoren, auf bestimmte Interfluorophorabstände geschlossen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass DNA-Origami Konstrukte, aufgrund einer niedrigen Inkorporationseffizienz, eher nachteilhaft für aussagekräftige Analysen sind, da hier ein breites Spektrum an Cy5-inkorporierten DNA-Origami Strukturen ermittelt wurde, wobei nur wenige vollständige 4-fach Cy5 Farbstoff inkorporierte Konstrukte hergestellt werden konnten.

Durch Zusammenarbeit mit Alexander Kuhleemann vom Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg konnten darüber hinaus auch im

---

Weitfeld an biologischen Proben erfolgreich das Blinkverhalten von mehrfach markierten Rezeptoren unterschiedlicher Interfluorophorabstände, durch spezifische Analysen, bestimmt und Unterschiede aufgezeigt werden, wobei noch weitere Folgeexperimente durchgeführt werden müssen, um auch in diesen biologischen Proben mittlere Farbstoffabstände robust analysieren zu können. Für räumliche Auflösungen im sub-10 nm Bereich sollte neben einer hohen Lokalisationsgenauigkeit der Emitter, die Zielstruktur unter anderem eine hohe Farbstoffkopplungsdichte mit geringem Abstandsfehler aufweisen. Somit steigt auch die Wahrscheinlichkeit geringer Interfluorophordistanzen an und damit verbunden auch starker und schwacher Farbstoffwechselwirkungen. Dies führt dazu, dass auch bei einer hohen Lokalisationsgenauigkeit, durch Energieübertragung- und Annihilationsprozessen nicht alle Farbstoffe detektiert und damit lokalisiert werden können. In dieser Arbeit konnte durch die aufgezeigten Ergebnisse, ein Grundstein einer neuen Analyse- und Abstandsmessmethode zur Stöchiometrie- und Abstandsbestimmung im sub-10 nm Raum gelegt werden. Das Potenzial dieser Methode kann unter konfokalen *d*STORM-Bedingungen, in Kombination mit der effizienten und spezifischen Kopplungsmethode der Klick-Chemie, zukünftig noch besser ausgeschöpft werden. Eine Möglichkeit diese Herausforderungen der molekularen Auflösung zu umgehen bietet beispielsweise die Lokalisationsmikroskopiemethode DNA-PAINT, da hier die farbstoffgekoppelten Belichtungsstränge stochastisch vereinzelt an der Zielstruktur gebunden sind und damit keine Farbstoffinteraktionen auftreten. Jedoch ist der limitierende Faktor dieser Methode die Länge der verwendeten Oligonukleotidsequenzen, die zumeist mehrere DNA-Basen und damit mehrere Nanometer lang sind. Darüber hinaus konnte durch chemisch effizient synthetisierte Dendronstrukturen unterschiedlicher Verzweigungslängen bzw. Interfluorophorabständen dargelegt werden, dass diese Strukturen, ähnlich wie mehrfach farbstoffmarkierte Antikörper, ein komplexes spektroskopisches Verhalten zeigen. Dieses Verhalten ist auf starke und schwache Farbstoffwechselwirkungen zurückzuführen. Auch eine Reduktion der H-Dimere führt zu keiner drastischen Erhöhung des Fluoreszenzsignals dieser Strukturen, sodass die Emissionsintensität stets unterhalb der Signalstärke eines einzelnen Referenzfarbstoffes liegt. Diese Dendronstrukturen geben ihre Anregungsenergie nicht gebündelt in Emission ab, sondern werden durch Energieübertragungsprozesse beeinflusst, die in der Reduktion des Fluoreszenzsignals und der Fluoreszenzlebenszeit resultieren. Diese Prozesse sind dabei vermutlich vergleichbar zu den dargelegten Energieübertragungsmechanismen der DNA-Origami Konstrukte. Durch die effiziente

---

chemische Synthese dieser Strukturen, die freie Gestaltung unterschiedlicher Interfluorophorabstände und Fluorophoranzahlen können diese Dendronstrukturen als starkes Werkzeug zum Verständnis von Energieübertragungsprozessen zwischen Cyaninfarbstoffen im sub-10 nm Bereich dienen.

---

## 7 Ausblick

In dieser Arbeit konnten diverse neue Einblicke und Erkenntnisse des photophysikalischen und photochemischen Verhaltens von Cyaninfarbstoffen gewonnen werden. Diese Farbstoffklasse ist unter anderem in der stochastischen Lokalisationsmikroskopie weit verbreitet und wird hier aufgrund ihres Blinkverhaltens oft verwendet. Das photochemische Verhalten dieser Farbstoffklasse ist schon lange wissenschaftlicher Bestandteil zahlreicher Analysen und wird bis heute kontrovers diskutiert.

### Photochemische Zerschneidung von Cyaninfarbstoffen

Hier konnte ein neuer Mechanismus chemisch entschlüsselt werden, der darlegt, dass Cyaninfarbstoffe eine Verkürzung des konjugierten Doppelbindungssystem unterlaufen. Die Effizienz dieser chemischen Reaktion ist dabei auch von der Mikroumgebung bzw. der Pufferlösung abhängig. Dabei muss in weiteren Experimenten geklärt werden, welchen Einfluss diese Pufferlösungen auf diesen chemischen Mechanismus haben bzw. warum bestimmte Pufferbedingungen diese Reaktion begünstigen bzw. behindern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses photochemische Phänomen der Zerschneidung von Cyaninfarbstoffen vorteilhaft für die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie eingesetzt werden kann. Hierbei war allerdings ersichtlich, dass die Effizienz der Umwandlung von Cyaninfarbstoffen für DNA-PAINT basierende Methoden in einfachen Salzpuffern ( $\text{pH} \sim 7,4$ ), ohne weitere Zusätze, zu hoch ist (Abb. 21 und Tab. 1). Im Zusammenhang mit zukünftigen Analysen des chemischen Einflusses der Pufferbedingungen auf die Effizienz dieser Photozerschneidung von Cyaninfarbstoffen, müssten hier weitere Optimierungsexperimente dieser Lokalisationsmikroskopiemethode durchgeführt werden, wobei die Effizienz der Cyaninfarbstoffumwandlung gesenkt werden müsste. Des Weiteren könnten hier ebenso Dendronstrukturen, gekoppelt mit Cy5-Farbstoffen, eingesetzt werden, um via Klick-Chemie die Kopplungsdichte an zellulären Zielstrukturen zu erhöhen. Aus den analysierten spektroskopischen Eigenschaften der verwendeten Dendronstrukturen ist ersichtlich, dass diese Strukturen, wie bei den Farbstoff-gekoppelten Antikörpern, ebenso H-Dimere ausbilden können (Abb. 48 und Abb. 49). Dies könnte für Aufnahmen dieser Photozerschneidungsmethode im Weitfeld für ein zeitliches Repertoire der Farbstoffumwandlungen sorgen, da aus dem Monomer – H-Dimer Gleichgewicht vorwiegend

---

monomerische Farbstoffe den Mechanismus der Photozerschneidung unterlaufen. Im Zusammenhang mit der hohen Kopplungsdichte, des relativ geringen Kopplungsabstandes, der Bereitstellung von mehreren Cy5 Farbstoffen je Klick-Reaktion bzw. Dendronsystem und der relativ kleinen Kopplungsart an zellulären Zielstrukturen könnten hier im Weitfeld eventuell ebenso qualitativ hochwertige Rekonstruktionen erzielt werden, die in dieser Arbeit an immunomarkierten zellulären Zielstrukturen noch nicht erzielt werden konnten.

### **Analyse des photophysikalischen Fingerabdruckes von Cyaninfarbstoffen**

Für Einzelmolekülanalysen des photophysikalischen Fingerabdruckes im Weitfeld ist eine homogene Ausleuchtung der Proben ein kritischer Faktor. Die hier analysierten Einzelmoleküloberflächen der DNA-Origami wurden im Weitfeld im EPI Illuminationsmodus beleuchtet um eine möglichst homogene Belichtung der Probe zu gewährleisten. Bei einem einfachen Weitfeldaufbau ist das Anregungsprofil zumeist gaussförmig und somit fällt die Anregungsleistung zu den Rändern der Belichtungsregion stark ab [106]. Dies beeinflusst damit auch das photophysikalische Blinkverhalten der angeregten Moleküle im Fokus [106]. Um eine möglichst homogene Ausleuchtung zu erzielen, können zukünftige Experimente zur Analyse von Einzelmoleküloberflächen im Weitfeld eine Flachfeld-Anregung (engl.: flat-field) auf Basis eines mikroelektromechanischen Spiegels (engl.: microelectromechanical system, MEMS) nutzen [106]. Dies würde zu homogenen Bedingungen der Anregung führen, was unterschiedliche photophysikalische Verhalten der Farbstoffe aufgrund unterschiedlicher Anregungsintensitäten minimieren bzw. eliminieren würde [106]. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass DNA-Origami Konstrukte aufgrund niedriger Inkorporationseffizienzen nachteilhaft für robuste Analysen im Weitfeld sind, da diese Konstrukte Subpopulationen unterschiedlicher Farbstoffanzahlen des berechneten Interfluorophorabstandes aufwiesen und nur ein geringer Anteil der hybridisierten Konstrukte 4-fach Cy5 markiert war. Für robustere und sensiblere Analysen dieses photophysikalischen Fingerabdruckes von Cyaninfarbstoffen können allerdings zukünftig chemisch effizient synthetisierte Dendronstrukturen dienen (Abb. 12). Diese Dendronstrukturen könnten genutzt werden, um in einem derartig definierten System, die Energieübertragungsprozesse und -effizienzen genau zu untersuchen. Ein solches System bietet den Vorteil, dass Interfluorophorabstände, ähnlich wie bei DNA-Origami Konstrukten, genau definiert werden



können, aber im Kontrast dazu diese Dendronstrukturen mit hoher Effizienz chemisch synthetisiert werden können. Dies resultiert in einem System bestehend aus genau definierten Farbstoffanzahlen und Farbstoffabständen. Des Weiteren können die Interfluorophorabstände in einem solchen Dendronsystem, trotz der relativ hohen Freiheitsgrade der gekoppelten Farbstoffe, über chemische Computerprogramme relativ genau berechnet werden. Darüber hinaus ist es chemisch möglich, die jeweiligen Farbstoffe untereinander zu verknüpfen. Dies würde die Position der Farbstoffe starr festlegen und für genau definierte Interfluorophorabstände sorgen, allerdings würden hier die Freiheitsgrade reduziert werden, was eventuell aufgrund der Dipolwinkel zueinander, Einfluss auf die Effizienzen resonanter Energieübertragungswege nimmt.

Ein solches Modell zur genauen Analyse der abstandsabhängigen Energieübertragungsprozesse von Cyaninfarbstoffen kann dabei auch relativ einfach kommerziell durch gekoppelte lineare Oligonukleotide hergestellt werden. Im Vergleich zu den Dendronstrukturen würde dieses Modell jedoch nur im zweidimensionalen Raum gültig sein, wohingegen die Dendronstrukturen drei Dimensionen abdecken würden. Des Weiteren kann es zu Farbstoffwechselwirkungen mit Nukleotiden kommen, die die Fluoreszenzeigenschaft und das photophysikalische Verhalten der Farbstoffe unterschiedlich beeinflussen können [107, 108]. Dennoch könnte durch ein derartiges Konstrukt aus einer kurzen Oligonukleotidsequenz relativ einfach ein zweidimensionales molekulares Referenzmodell bzw. molekulares Lineal des photophysikalischen Fingerabdruckes von Cyaninfarbstoffen erstellt werden. Auch hier können die Abstände zwischen den Farbstoffen frei gewählt und genau berechnet werden. Da es sich um nur eine kurze Oligonukleotidsequenz handeln würde, wäre die Hybridisierungseffizienz, im Vergleich zu den komplexen DNA-Origami Konstrukten, wahrscheinlich relativ hoch. Des Weiteren könnte durch biotinylierte Gegenstränge gewährleistet werden, dass auf Einzelmoleküloberflächen, via Avidin – Biotin Immobilisierung, nur doppelsträngige Farbstoff-gekoppelte Oligonukleotide binden können. Mit solchen Konstrukten könnten konfokal bzw. im Weitfeld im Flachfeld-Belichtungsmodus mit relativ einfachen Mitteln eine abstandsabhängige Energieübertragungskurve bzw. Photoaktivierungskurve von Cyaninfarbstoffen erstellt werden, die ein spezifisches Blinkverhalten vorhersagen, das auf die Analysen von möglichen gekoppelten Zielstrukturen übertragen werden kann. Dies könnte dabei nicht nur für Cyaninfarbstoffe durchgeführt werden, sondern auch auf andere Farbstoffklassen

angewendet werden, die ein ähnliches Blinkverhalten aufzeigen [83]. Diese Farbstoffklassen müssten allerdings zuerst auf die Anwendbarkeit der Methode getestet werden. Des Weiteren könnte die Auswertemethode des photophysikalischen Fingerabdruckes von Cyaninfarbstoffen im Weitfeld weiter optimiert werden und weitere Auswerteroutinen getestet werden. Wenn vereinfacht angenommen wird, dass jeder Cyaninfarbstoff eine begrenzte Anzahl an Blinkereignissen zeigen kann, könnte hier zusätzlich auf zeitliche Kriterien des abstandsabhängigen Blinkverhalten geachtet werden. Hierbei könnte beispielsweise zusätzlich analysiert werden, ab wann ein gewisser Prozentsatz der totalen Blinkereignisse eines Emitters bzw. eines 4-fach markierten DNA-Origami Konstruktes erreicht ist. Falls dies zu zuverlässigen und eindeutigen Ergebnissen führt, könnten auch im Weitfeld unter *d*STORM-Bedingungen robuste Aussagen über die Anzahl der Emitter und deren Interfluorophorabständen getroffen werden. Des Weiteren könnten ebenso Weitfeldaufnahmen mit einer höheren zeitlichen Auflösung des Detektors, beispielsweise durch die Nutzung einer sCMOS Kamera, generiert werden. Hiermit könnte durch niedrigere Integrationszeiten versucht werden, die schnellen Blinkereignisse kurzer Fluorophordistanzen zu Beginn der Messung zu detektieren. Darüber hinaus weisen die erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse darauf hin, dass zukünftige *d*STORM-Messungen, für robuste abstandsabhängige Analysen, bevorzugt unter konfokalen Bedingungen mit einer hohen und sensitiven zeitlichen Auflösung durchgeführt werden sollten. Dies müsste ebenso mit den präparierten biologischen Proben getestet werden, um auch hier anhand der Blinkprofile der Cyaninfarbstoffe unterschiedlicher Interfluorophorabstände robuste Analysen zu den mittleren Farbstoffabständen durchzuführen.

### **Steigerung des Fluoreszenzsignals von Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen**

Die analysierten Dendronstrukturen (Abb. 12) zeigen keine gebündelte Emission des absorbierten Lichts, sondern komplexe starke und schwache Farbstoffwechselwirkungen die zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals führen (Abb. 49). Diese Moleküle zeigen spektroskopisch ein ähnlich Verhalten wie die mehrfach Cyanin-gekoppelten Antikörper. Daher ist davon auszugehen, dass diese Dendronstrukturen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch unter *d*STORM-Bedingungen ein vergleichbares Verhalten zeigen wie die mehrfach markierten Antikörper und ebenso komplexe spezifische Energieübertragungsmechanismen

aufweisen wie bei den analysierten mehrfach markierten DNA-Origami Strukturen. Diese Energieübertragungsprozesse wären dabei für einen Cyanin-basierten Superemitter hinderlich. Dies muss in zukünftige Einzelmolekülexperimente im Weitfeld unter *d*STORM-Bedingungen analysiert werden. Hierbei könnte für eine homogene Ausleuchtung der Proben, was ein kritischer Parameter für das Blinkverhalten im Weitfeld ist, eine Flachfeld-Anregung genutzt werden [106]. Darüber hinaus könnte versucht werden, die gekoppelten Farbstoffe so zu modifizieren und positionieren, dass diese unabhängig voneinander emittieren können. Die auftretenden starken und schwachen Farbstoffwechselwirkungen der Dendronstrukturen, wie beispielsweise H-Dimere oder Resonanzenergieübertragungen, hängen dabei stark von der Distanz und den Dipolwinkeln der beteiligten Farbstoffe ab [40, 41, 42, 43, 44, 94]. So könnte einerseits der Interfluorophorabstand durch eine weitere Verlängerung der Kohlenwasserstoffkette zum Verzweigungspunkt vergrößert werden. Wie in den Messungen der Dendronstrukturen unterschiedlicher Kohlenwasserstoffkettenlänge bzw. Interfluorophordistanzen zu erkennen ist, hätte dies einen direkten Einfluss auf die Ausbildung von H-Dimeren und damit auf das Fluoreszenzverhalten der Farbstoffe (Abb. 48 und Abb. 49). Dies hätte aber eine Vergrößerung des gesamten Dendronkonstruktes zur Folge und damit einhergehend einen höheren Abstandsfehler zur Zielstruktur, was für hochauflösende Methoden nachteilhaft wäre. Andererseits könnten die am Dendron gekoppelten Farbstoffe durch asymmetrische Seitengruppenreste chemisch verändert werden, sodass diese Farbstoffe sterisch beeinträchtigt werden H-Dimere auszubilden. Abhängig vom Dipolwinkel der beteiligten Farbstoffe, könnte dies die Emissionsintensität steigern. Des Weiteren könnten die Farbstoffe eines Dendrons untereinander chemisch quervernetzt werden, wodurch fixe Dipolorientierungen entstehen würden. Dies könnte zu einer Eliminierung von H-Dimeren führen und damit verbunden auch zu einer Steigerung der Emissionsintensität der Cyanin-gekoppelten Dendronstrukturen. Durch komplexe Berechnungen könnten, theoretisch betrachtet, bei einem fixen Interfluorophorabstand und nicht frei rotierenden Farbstoffen diese so quervernetzt werden, sodass die Dipolmomente in einem Winkel zueinander stehen, der keine oder uneffiziente Resonanzenergieübertragungseffekte erlauben würde [40]. Dies würde eine Steigerung der Emissionsintensität mit sich führen, da diese Farbstoffe unabhängig voneinander fluoreszieren. Des Weiteren könnten die Farbstoffe vor möglichen Energieübertragungsprozessen mithilfe der Supramolekularen Chemie abgeschirmt werden [109, 110, 111]. Hierbei können verschiedene ringförmige Kohlenwasserstoffmoleküle,

---

unterschiedlicher Durchmesser, verwendet werden, die sich um die jeweiligen Farbstoffe legen bzw. diese einschließen [109, 110, 111]. Hierdurch werden diese Farbstoffe von der jeweiligen Umgebung und deren Einflüsse abgeschirmt [109, 110, 111]. Hierzu sollten aber die Sulfonsäurereste der am Dendron gekoppelten Cyanine entfernt werden und ungeladene Cyanine benutzt werden, da die Ladung und die Größe der Seitenreste hinderlich für eine Umschließung der Farbstoffe durch die ringförmigen Moleküle ist [109, 110, 111]. Darüber hinaus muss hier auch unter *d*STORM-Bedingungen getestet werden, ob der abgeschirmte Farbstoff photochemisch zum Schalten gebracht werden kann, oder ob die Abschirmung verhindert, dass der Cyaninfarbstoff durch Thiole reduziert werden kann. Darüber hinaus könnten auch Dendronstrukturen synthetisiert werden, die mit anderen Farbstoffklassen gekoppelt sind, die ebenso einen Schaltmechanismus zeigen und für stochastische Rekonstruktionsmikroskopiemethoden geeignet sind. So könnten beispielsweise der Silicium-Rhodaminfarbstoff HMSiR (engl.: hydroxymethyl silicium-rhodamine) verwendet werden, der einen chemischen Schaltmechanismus, abhängig vom pH-Wert der Lösung, aufweist und damit nicht photochemisch induziert ist [112]. Hierdurch könnte eine Vielzahl unabhängig emittierender und schaltender Farbstoffen auf engen Raum an eine Zielstruktur gekoppelt werden, die eine hohe Emissionsintensität zeigen könnten.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- 1) D. Gerlach, „*Geschichte der Mikroskopie*“, Harri Deutsch, Erlangen, 1, Auflage, 2009
- 2) R. Hooke, „*Micrographia*“, Dover Publications, Inc; Mineola, New York, 2003
- 3) E. Abbe, "*The Relation of Aperture and Power in the Microscope (continued)*", Journal of the Royal Microscopical Society, 2, 790-812, 1873
- 4) E. Abbe, "*Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*", Arch, Mikrosk, Anat,, 9:413-420, 1873
- 5) G. G. Stokes, "*On the Change of Refrangibility of Light*" Philosophical Transactions of the Royal Society of London; Vol, 142 (1852), pp, 463-562, 1852
- 6) O. Heimstädt, „*Das Fluoreszenzmikroskop*“, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Band 28, S, 330-337, 1911
- 7) Stanislaus von Prowazek, „*Fluoreszenz der Zellen – Reicherts Fluoreszenzmikroskop*“, Zoologischer Anzeiger, Band 42, S, 374-380, 1913
- 8) H. Daniel, „*Physik III Optiks, Thermodynamik, Quanten*“, De Gruyter, Berlin, 1, Auflage, 1998
- 9) H. Niedrig, „*Optik, Wellen und Teilchenoptik*“, De Gruyter, Berlin, 10, Auflage, 2004
- 10) M. Sauer, J. Hofkens and J. Enderlein, „*Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*“, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaG, Weinheim, 2011
- 11) S. W. Hell and J. Wichmann, „*Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*“, Optics Letters, Band 19, Nr, 11, S, 780-782, 1994
- 12) S. W. Hell, „*Far-Field Optical Nanoscopy*“, Science, Vol, 316, S, 1153-1158, 2007
- 13) G. Patterson et al,, "*Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization*", Annu, Rev, Phys, Chem, 61, 345-367, 2010
- 14) E. Betzig et, al,, „*Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*“, Science, Vol, 313, S,1642-1645, 2006

- 15) Sebastian van de Linde et al., *“Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes”*, Nature Protocols 6, 991-1009, 2011
- 16) Sebastian van de Linde and Markus Sauer, *“How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching”*, Chem, Soc, Rev., 43, 1076-1087, 2014
- 17) B. Huang et al., *“Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy,”* Science 319, 810-813, 2008
- 18) M. F. Juetten et al., *“Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples,”* Nat, Methods 5, 527-529, 2008
- 19) B. Huang, M. Bates and X. Zhuang, *„Super-Resolution Fluorescence Microscopy“*, Annual Review of Biochemistry, Vol, 78, S, 993-1016, 2009
- 20) Y. Shechtman et al., *„Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering“*, Nature Photonics 10, S, 590-594, 2016
- 21) Sebastian van de Linde et al., *„Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging“*, Photochem, Photobiol, Sci, 8, 465-469, 2009
- 22) A. Lampe et al., *“Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines”*, Biology of the Cell, Volume 104, Issue 4, 229-237, 2012
- 23) A. Lampe et al., *“Spectral demixing avoids registration errors and reduces noise in multicolor localization – based super – resolution microscopy“*, Methods Appl, Fluoresc., Vol, 3, 034006, 2015
- 24) T. Niehörster et al., *“Multi-target spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy“*, Nature Methods 13, 257-262, 2016
- 25) J. C. Thiele et al., *„Confocal Fluorescence-Lifetime Single-Molecule Localization Microscopy“*, ACS nano, Band 14, Ausgabe 10, S, 14190-14200, 2020
- 26) G. T. Hermanson, *„Bioconjugate Techniques“*, Pierce Biotechnology, Elsevier Inc., 2, Auflage, 2008
- 27) G. J. L. Bernardes et al., *„Site-Specific Chemical Modification of Antibody Fragments Using Traceless Cleavable Linkers“*, Nat, Protoc., 8, 2079-2089, 2013

- 
- 28) K. Weber et al., „*Cytoplasmic Microtubular Images in Glutaraldehyde-Fixed Tissue Culture Cells by Electron Microscopy and by Immunofluorescence Microscopy*“, Proc, Natl, Acad, Sci,, USA, 75, 1820-1824, 1978
- 29) J. Hofkens et al., „*Revealing competitive Förster-Type Resonance Energy Transfer Pathways in Single Bichromophoric Molecules*“, Proc, Natl, Acad, Sci,, USA, 100, 13146-13151, 2003
- 30) S. Masuo et al., „*Multichromophoric Dendrimers as Single Photon Sources: A Single Molecule Study*“, J, Phys, Chem,, 108, 16686-16696, 2004
- 31) A. Szabo et al., „*The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes*“, Biophys, J,, 114, 688-700, 2018
- 32) D. Deschout et al., „*Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy*“, Nat, Methods, 11, 253-266, 2014
- 33) K. Weber et al., „*Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy*“, Proc, Natl, Acad, Sci,, USA 75, 1820-1824, 1978
- 34) G. Beliu et al., „*Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy*“, Communications Bio, 2, 261, 2019
- 35) F. Neubert & G. Beliu et al., „*Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging*“, Angewandte Chemie, Vol 57, Ausgabe 50, S, 16364-16369, 2018
- 36) K. Johann et al., „*Tetrazine- and trans-cyclooctene-functionalised polypept(o)ides for fast bioorthogonal tetrazine ligation*“, Polym, Chem,, 11, 4396-4407, 2020
- 37) M. L. Blackman et al., „*Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity*“, J, Am, Chem, Soc,, 130, 41, 13518-13519, 2008
- 38) A. Darko et al., „*Conformationally strained trans-cyclooctene with improved stability and excellent reactivity in tetrazine ligation*“, Chem, Sci,, 5, 3770-3776, 2014
- 39) Dr. L. Dirix et al., „*Photoconversion of Far-Red Organic Dyes: Implications for Multicolor Super-Resolution Imaging*“, ChemPhotoChem, 2, 433-441, 2018
- 40) J. R. Lakowicz, „*Principles of Fluorescence*“, Springer, New York, 3, Edition, 2006

- 
- 41) H. Haken and H. C. Wolf, „*Molekülphysik und Quantenchemie*“, Springer, Heidelberg, 5, Auflage, 2006
  - 42) T. Förster, „*Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*“, Ann, Phys., 2, 55-75, 1948
  - 43) A. Eisfeld and J. S. Briggs, „*The J- and H-bands of organic dyes*“, Chemical Physics, 324, 376-384, 2005
  - 44) N. J. Hestand and F. C. Spano, „*Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer*“, Chem, Rev., 118, 15, 7069-7163, 2018
  - 45) S. Wolter et al., „*rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy*“, Nature Methods, 9, 1040-1041, 2012
  - 46) T. D. Graham et al., „*Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes*“, In: Journal of the American Chemical Society 131,51, 18192-18193, 2009
  - 47) Sebastian van de Linde et al., „*The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging*“, Journal of Biotechnology, 149, 4, 260-266, 2010
  - 48) C. E. Shannon, „*Communication in the presence of noise*“, Proc, Inst, Radio Eng., 37, 10-21, 1949
  - 49) R. E. Benesch et al., „*Enzymatic Removal of Oxygen for Polarography and Related Methods*“, Science, 118, 3068, 447-448, 1953
  - 50) M. Ovesný et al., „*ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging*“, Bioinformatics, 30(16), 2389-2390, 2014
  - 51) K. I. Mortensen et al., „*Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy*“, Nature Methods, 7, 377-381, 2010
  - 52) J. D. Watson and F. H. C. Crick, „*THE STRUCTURE OF DNA*“, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 18, 123-131, 1953
  - 53) P. W. Rothemund, „*Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*“, Nature, 440(7082):297-302, 2006



- 
- 54) E. A. B. Kantchev et al., „*Direct solid-phase synthesis and fluorescence labeling of large, monodisperse mannosylated dendrons in a peptide synthesizer*“, *Org, Biomol, Chem*, 6, 1377-1385, 2008
- 55) E. A. B. Kantchev et al., „*Direct Fmoc/tert-Bu solid phase synthesis of octamannosyl polylysine dendrimer-peptide conjugates*“, *Biopolymers*, 84, 232-240, 2006
- 56) A. Clouet et al., „*Combinatorial synthesis, selection, and properties of esterase peptide dendrimers*“, *Biopolymers*, 84, 114-123, 2006
- 57) L. Crespo et al., „*Branched poly(proline) peptides: An efficient new approach to the synthesis of repetitive branched peptides*“, *Eur, J, Org, Chem*, 2002, 1756-1762, 2002
- 58) H. Tsushima et al., „*Solid-phase synthesis of aromatic polyamide dendrons*“, *Polym, Advan, Technol*, 22, 1292-1296, 2011
- 59) A. Dahan et al., „*Synthesis of poly(aryl benzyl ether) dendrimers on solid support*“, *Macromolecules*, 36, 1034-1038, 2003
- 60) M. Ovesný, P. Křížek, J. Borkovec, Z. Švindrych, G. M. Hagen, „*ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plugin for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging*“, *Bioinformatics* 30(16):2389-2390, 2014
- 61) R. P. Nieuwenhuizen, K. A. Lidke, M. Bates, D. L. Puig, D. Grünwald, S. Stallinga, B. Rieger, „*Measuring image resolution in optical nanoscopy*“, *Nature methods*, 10(6), 557-562, 2013
- 62) J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise et al., „*Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*“ *Nat, Methods*, 9, 676-682, 2012
- 63) J. J. Schmied, M, Raab, C, Fortmann et al., „*DNA origami–based standards for quantitative fluorescence microscopy*“, *Nat, Protoc*, 9, 1367-1391, 2014
- 64) S. M. Douglas et al., „*Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes*“, *Nature*, 459, 414-418, 2009
- 65) S. M. Douglas et al., „*Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAo*“, *Nucleic Acids Res*, 37, 5001-5006, 2009

- 
- 66) D. N. Kim, F. Kilchherr, H. Dietz, M. Bathe, „*Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures*“, *Nucleic Acids Res*,(7), 2862-2868, 2012
- 67) C. Castro, F. Kilchherr, D. N. Kim *et al.*, „*A primer to scaffolded DNA origami*“, *Nat Methods* 8, 221-229, 2011
- 68) O. V. Stepanenko, O. V. Stepanenko, D. M. Shcherbakova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov & V. V. Verkhusha, „*Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications*“, *Biotechniques*, 51, 5, 313-327, 2011
- 69) M. C. DeRosa, Robert J Crutchley, „*Photosensitized singlet oxygen and its applications*“, *Coordination Chemistry Reviews, Volumes 233-234*, 351-371, 2002
- 70) J. Wiedenmann, S. Ivanchenko, F. Oswald, F. Schmitt, C. Rucker, A. Salih, K. D. Spindler, G. U. Nienhaus, „*EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion*“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (45), 15905-15910, 2004
- 71) A. N. Butkevich, M. L. Bossi, G. v. Lukinavičius, S. W. Hell, „*Triarylmethane fluorophores resistant to oxidative photobleaching*“, *Journal of the American Chemical Society*, 141 (2), 981-989, 2018
- 72) N. Evans, „*Photofading of Rhodamine Dyes: I—Identification of some Rhodamine B Photoproducts*“, *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 86 (4), 174-177, 1970
- 73) J. Robinson-Duggon, N. Marino-Ocampo, P. Barrias, D. Zuniga-Nunez, G. Gunther, A. M. Edwards, A. Greer, D. Fuentealba, „*Mechanism of Visible-Light Photooxidative Demethylation of Toluidine Blue O*“, *J Phys Chem A*, 123 (23), 4863-4872, 2019
- 74) S. Bollmann, M Löllmann, M. Sauer, S. Dose, „*Dimer formation of organic fluorophores reports on biomolecular dynamics under denaturing conditions*“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 28;13(28), 2011
- 75) B. Donaphon *et al.*, „*Photophysical characterization of interchromophoric interactions between rhodamine dyes conjugated to proteins*“, *Methods Appl. Fluoresc.*, 6(4), 2018
- 76) D. Ayoub, W. Jabs, A. Resemann, W. Evers, C. Evans, L. Main, C. Baessmann, E. Wagner-Rousset, D. Suckau, A. Beck, „*Correct primary structure assessment and extensive glyco-*

- profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques", *MAbs*, 5(5):699-710, 2013
- 77) W. West und S. Pearce, „The Dimeric State of Cyanine Dyes“, *The Journal of Physical Chemistry*, 69, 6, 1894-1903, 1965
- 78) A. K. Chibisov, „Photonics of Dimers of Cyanine Dyes“, *High Energy Chemistry*, 41, 3, 200-209, 2007
- 79) V. Buschman, K. D. Weston & M. Sauer, „Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes“, *Bioconjugate Chem.* 14, 195-204, 2003
- 80) J. Widengren und P. Schwille, „*Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy*“, *The Journal of Physical Chemistry A*, 104 (27), 6416-6428, 2000
- 81) W. West und S. Pearce, „*The Dimeric State of Cyanine Dyes*“, *The Journal of Physical Chemistry*, 69 (6), 1894-1903, 1965
- 82) G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, X. Zhuang, „*Photoswitching mechanism of cyanine dyes*“, *J. Am. Chem. Soc.*, 131(51), 18192-18193, 2009
- 83) S. van de Linde, I. Krstić, T. Prisner, S. Doose, M. Heilemann, M. Sauer, „*Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging*“, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 499-506, 2011
- 84) J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, „*A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes*“, *Angewandte Chemie*, 47(29), 5465-5469, 2008
- 85) T. Cordes, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, „*On the mechanism of Trolox as antiblinking and antibleaching reagent*“, *J. Am. Chem. Soc.*, 131(14):5018-5020, 2009
- 86) S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, P. Tinnefeld, S. Habuchi, T. D. M. Bell, I. Oesterling, D. Beljonne, B. Champagne, K. Müllen, M. Sauer, J. Hofkens und F. C. De Schryver, „*Multichromophoric Dendrimers as Single-Photon Sources: A Single-Molecule Study*“, *The Journal of Physical Chemistry B*, 108 (43), 16686-16696, 2004

- 
- 87) P. Tinnefeld, K. D. Weston, T. Vosch, M. Cotlet, T. Weil, J. Hofkens, K. Müllen, F. C. De Schryver und M. Sauer, „*Antibunching in the Emission of a Single Tetrachromophoric Dendritic System*“, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (48), 14310-14311, 2002
- 88) K. Großmayer, D. – P. Hertel, „*Time-resolved Molecule Counting by Photon Statistics Across the Visible Spectrum*“, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19(13), 2017
- 89) M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, H. Kobayashi, „*H-type dimer formation of fluorophores: a mechanism for activatable, in vivo optical molecular imaging*“, *ACS Chem Biol.*, 17,4(7), 535-546, 2009
- 90) D. L. Andrews, A. A. Demidov, „*Resonance Energy Transfer*“, Wiley: New York, 1. Auflage, 1999
- 91) F. Balzarotti *et al.*, „*Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes*“, *Science*, 355, 606-612, 2017
- 92) J. Cnossen *et al.*, „*Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination*“, *Nat Methods*, 17, 59-63, 2020
- 93) K. C. Gwosch, J. K. Pape, F. Balzarotti, P. Hoess, J. Ellenberg, J. Ries, S. W. Hell, „*MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells*“, *Nat Methods*, 17, 217-224, 2020
- 94) G. D. Scholes, „*Long-range resonance energy transfer in molecular systems*“, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 54, 57-87, 2003
- 95) B. Corry, D. Jayatilaka, P. Rigby, „*A flexible approach to the calculation of resonance energy transfer efficiency between multiple donors and acceptors in complex geometries*“, *Biophys. J.*, 89, 3822-2836, 2005
- 96) Z. Huang, D. Ji, A. Xia, F. Koberling, M. Patting, R. Erdmann, „*Direct observation of delayed fluorescence from a remarkable back-isomerization in Cy5*“, *J. Am. Chem. Soc.*, 127(22), 8064-8066, 2005
- 97) Z. Huang, D. Ji, S. Wang, A. Xia, F. Koberling, M. Patting, R. Erdmann, „*Spectral Identification of Specific Photophysics of Cy5 by Means of Ensemble and Single Molecule Measurements*“, *J. Am. Chem. Soc.*, 110(1), 45-50, 2006

- 
- 98) Y. Gidi, L. Payne, V. Glembockyte, M. S. Michie, M. J. Schnermann, G. Cosa, „*Unifying Mechanism for Thiol-Induced Photoswitching and Photostability of Cyanine Dyes*“, J. Am. Chem. Soc., 142(29), 12681-12689, 2020
- 99) W. Wisden, P. H. Seeburg, „*GABAA receptor channels: from subunits to functional entities*“, Curr. Opin. Neurobiol., 2, 263-269, 1992
- 100) J. Lerma, „*Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission*“, Nat. Rev. Neuroscience, 4, 481-495, 2003
- 101) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, „*Chemistry in living systems*“, Nat. Chem. Biol., 1, 13-21, 2005
- 102) C. C. Liu, P. G. Schultz, „*Adding new chemistries to the genetic code*“, Annu. Rev. Biochem., 79, 413-444, 2010
- 103) G. Beliu, et al., „*Tethered agonist exposure in intact adhesion/class B2 GPCRs through intrinsic structural flexibility of the GAIN domain*“, Mol. Cell, 81, 905-921, 2021
- 104) D. Bessa-Neto, et al., „*Bioorthogonal labeling of transmembrane proteins with non-canonical amino acids allows access to masked epitopes in live neurons*“, bioRxiv, 2021, doi:<https://doi.org/10.1101/2021.02.27.433189>
- 105) M. Ester, H. P. Kriegel, J. Sander und X. Xu, „*A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise*“, In Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, AAAI Press, 226-231, 1996
- 106) L. Herdly, P. Janin, R. Bauer und S. v. d. Linde, „*Tunable Wide-Field Illumination and Single-Molecule Photoswitching with a Single MEMS Mirror*“, ACS Photonics 8(9), 2728-2736, 2021
- 107) C. Agbavwe, M. M. Somoza, „*Sequence-Dependent Fluorescence of Cyanine Dyes on Microarrays*“, PLOS ONE, 6(7), e22177, 2011
- 108) N. Kretschy, M. M. Somoza, „*Comparison of the Sequence-Dependent Fluorescence of the Cyanine Dyes Cy3, Cy5, DyLight DY547 and DyLight DY647 on Single-Stranded DNA*“, PLOS ONE, 9(1), e85605, 2014

- 
- 109) S. Gadde, E. K. Batchelor, J. P. Weiss, Y. Ling und A. E. Kaifer, „*Control of H- and J-Aggregate Formation via Host–Guest Complexation using Cucurbituril Hosts*“, *Journal of the American Chemical Society*, 130(50), 17114-17119, 2008
- 110) S. Gadde, E. K. Batchelor und A. E. Kaifer, „*Controlling the Formation of Cyanine Dye H- and J-Aggregates with Cucurbituril Hosts in the Presence of Anionic Polyelectrolytes*“, *Chem. Eur. J.*, 15, 6025-6031, 2009
- 111) R. N. Dsouza, U. Pischel und W. M. Nau, „*Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution*“, *Chemical Reviews*, 111(12), 7941-7980, 2011
- 112) S. N. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara et al., „*A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging*“, *Nature Chem* 6, 681-689, 2014

## 9 Anhang

Tabelle 10: DNA-Origami Oligonukleotidsequenzen

| Startpunkt | Endpunkt | Sequenz (5'-3')                                | Modifikation     |
|------------|----------|--|------------------|
| 10[7]      | 8[16]    | CGAATTCGCCGGTACCGATAGCATGTCAATCTACCTCGA        |                  |
| 1[56]      | 3[79]    | GTGGATGTTCTTCTAAGTGGTTGTATATCCCAATAATCGGC      |                  |
| 9[184]     | 11[175]  | TATACTACTTAGTTGGGCACAAGAATTGAGAGAGACTA         |                  |
| 17[184]    | 19[175]  | GTGAGTGAATAAATCAATAGAAACGTCACCAATACCTTTT       |                  |
| 14[71]     | 18[74]   | ATAAATCAAGTACCTTTAATTGCTTTCGGT                 | 3'-TCO/Cy5 (9nm) |
| 27[8]      | 27[7]    | ATGGTGGTAGAATAGCCCGAGATACCTGTTTG               |                  |
| 23[48]     | 20[56]   | AACTGGCTCATTATACAATCAGT                        |                  |
| 22[71]     | 25[74]   | CATAGTAAAGTATTAAGAG                            | 3'-TCO/Cy5 (9nm) |
| 2[159]     | 1[151]   | GACGACAATAAACAACGAGCCAGT                       |                  |
| 21[80]     | 16[88]   | AATACTGCAAACGAGAATCACCGGAACAGAGTATAACAG        |                  |
| 31[16]     | 28[24]   | ATTAAAGAACGTGGACTCCCTTAT                       |                  |
| 25[80]     | 20[88]   | GACTCCTCACAGTTAAAGAAAAATCTACGTTAGTTCAGA        |                  |
| 26[167]    | 29[183]  | GGAGGTTTCGTAACGATCTAAAAGTTTTGTAA               |                  |
| 13[24]     | 10[8]    | GTACCAAAGATGAACGGTAATCGTAAACGCT                |                  |
| 22[63]     | 20[48]   | GAGCAACTATCATATAATAGTACTTTACCC                 |                  |
| 8[175]     | 11[167]  | CAAATCCAATCGCAAGTAGGCTG                        |                  |
| 25[75]     | 27[79]   | GCTGACATTACCCGCTGGCTG                          |                  |
| 6[167]     | 9[183]   | TATTCTAAGCTAATATCAGAGAGATAACCTTA               |                  |
| 25[88]     | 22[80]   | AAGAGAAGATAACGCCAAAAGGAA                       |                  |
| 25[120]    | 21[127]  | CAGTACCATTAGGAATACCACATTATCTGACAGGAGGTTG       |                  |
| 13[88]     | 10[84]   | CAGTATGTTTTTTGAGAGAT                           | 3'-TCO/Cy5 (6nm) |
| 30[47]     | 32[24]   | AGACTTTTGGCTACAGCAGCATCGGAACGAGTCCAACGT        |                  |
| 19[112]    | 16[120]  | CTCCCTCAGAGCCGCCACTAAAGT                       |                  |
| 28[183]    | 28[184]  | TTCAGGTTTTACATCGGGAGAAACGTAGATT                |                  |
| 21[184]    | 23[175]  | AAACATCAGAAGATGATGAAGCCAGAATGGAATTCATTTT       |                  |
| 25[24]     | 22[8]    | TTGGGCTTCGACGATAAAAACCAAAATAGACC               |                  |
| 30[39]     | 32[48]   | TCATGAGGAATTCGACAACCTCGTATTAATCCGCGAAAAGA      |                  |
| 5[88]      | 2[80]    | GTGCATCTGAAACAAGAAAAATA                        |                  |
| 31[80]     | 28[88]   | CCAAAAGGAGCCTTACATGTTAC                        |                  |
| 24[175]    | 27[167]  | ACAAAATCGCGCAGAGTACAGTAA                       | 5' biotin        |
| 26[143]    | 31[135]  | GAACCGCCGTAACACTGTAGCATTATCGCCGAATTTCT         |                  |
| 14[7]      | 12[16]   | AAGTGTAAAGAGCCGGAAGCAGCTAAATCGGTTTCGCTCACA     |                  |
| 17[88]     | 14[80]   | TAAGAGGTTAATAGTAGTACATT                        |                  |
| 14[111]    | 17[101]  | GGAAAGTAAATATTACCATT                           |                  |
| 21[24]     | 19[15]   | CAAAAGAATCAAAATATCGCGTTTTAATCCCTTAATGAAT       |                  |
| 33[56]     | 28[48]   | TTGCCGTTTTTACGAGGACTAAGAAAGAGGAAGGGAAC         |                  |
| 14[159]    | 12[144]  | TTTACCAGCGCAAAGACGCAAAAGAAAGCCCTT              |                  |
| 29[56]     | 25[63]   | CAAAAGAAGTAAACAAGCTGCTCACTCTGAAACATGAA         |                  |
| 13[184]    | 15[175]  | AAGACGCTCGATAGCTTAGATCAATAGAAAATCCCTTAGA       |                  |
| 20[175]    | 23[167]  | TACATTTAACAAATTCGCGAATTA                       |                  |
| 29[152]    | 24[144]  | ATAGTTAGAGTACCCACCTCACGAGAGGGTACAGGAG          |                  |
| 17[24]     | 15[15]   | AACCAGACCAATAAAGCCTCAGAGCATAAATAGTGCCTAA       |                  |
| 3[144]     | 0[152]   | AGCCGTTTTATTTCTTCTTACC                         |                  |
| 5[24]      | 3[15]    | GAACAAACAGGTTTTCCAGTACGACGCTTTGGGCACG          |                  |
| 33[0]      | 32[16]   | TTGAGGATTTAGAAGTATTAGACTCAAAGGGC               |                  |
| 6[83]      | 7[79]    | GCACCCAGCTACGCGTCTT                            |                  |
| 23[16]     | 20[24]   | CCCTTACCCGCTGGCAGAGGCGG                        |                  |
| 9[102]     | 10[102]  | AAGCATTAGACCGGAGAGGG                           | 3'-TCO/Cy5 (6nm) |
| 11[16]     | 6[16]    | TGTTTCTGTGTGAAAGTCTGTATATGTACGTGAGCGAGTAAACAAC |                  |
| 29[88]     | 26[80]   | CCCCAGCGACAAGAACCGGATATT                       |                  |
| 5[56]      | 2[48]    | GTCACGTTTACGAGCAAAGGCGAT                       |                  |
| 15[48]     | 12[53]   | GTTTAGCTATATTTTGAAGAGAAGCC                     |                  |
| 9[56]      | 6[48]    | CAAAAACACCTGAATCAGCCAGCT                       | 3'-Cy5 (18nm)    |
| 2[135]     | 5[143]   | CTAATGCATCAGGAAGATCGCACT                       |                  |
| 29[24]     | 26[8]    | ACTACGAATGCCCTGACGAGAAACACCAGCAG               |                  |
| 21[88]     | 18[80]   | GGAATCGTCGTTTTTATCGGCATT                       |                  |
| 31[144]    | 28[152]  | TTGATACCGATAGTTGTACAAAAT                       |                  |
| 22[39]     | 25[48]   | TTACCAGAGAGATGGTTTAAATTTCA                     | 3'-TCO/Cy5 (9nm) |
| 17[120]    | 13[119]  | TAATTGCTCAACCGATTGAGGGAGTACATACA               |                  |
| 26[111]    | 29[111]  | GCCACCACCTCATTGATTATACCAAGCGCGA                |                  |
| 18[101]    | 21[111]  | GTAGCGCATAAATATTCAATTA                         |                  |
| 15[112]    | 12[117]  | TCATTAAGGTTGAATTAGATAGCCGAA                    | 5' biotin        |
| 6[135]     | 9[143]   | TCCCGACTACACCTGAAACAAAGT                       |                  |
| 26[7]      | 24[16]   | GCGAAAATGTTTCCCGCAGAACGAGTAGTAAAAGTTGCAG       |                  |
| 11[8]      | 11[7]    | GTCATAGCATTCCACACAACATACTAATCATG               |                  |
| 33[88]     | 29[87]   | AGTAACATAGGAACAACATAAAGGATCTTTGAC              |                  |
| 33[24]     | 30[8]    | TTACAACAAGTTTCCATTAACCGGGTAATGT                |                  |
| 3[16]      | 0[24]    | AATATAGGGGCTTGACGCCCTGG                        |                  |
| 31[48]     | 28[56]   | AGGCTTTGTTGAAAATTCAATCAT                       |                  |
| 16[79]     | 19[79]   | CAATTCTGCGAACGAGTCTTTTATAATCAAA                |                  |
| 1[16]      | 0[0]     | AAACGACGAGTACTCTATGATACCGACAGTG                |                  |
| 4[143]     | 7[135]   | AGCTTCCGGCACCCGCAATCCA                         |                  |
| 28[111]    | 31[103]  | AATCCGCGACCTGCTCATTGTATC                       |                  |
| 22[111]    | 27[111]  | CAACTAATGAACCTTGTAGTAAACGATGCATCTTTTACGGGATAG  |                  |
| 22[7]      | 20[16]   | AGTGAGACTTTTTCTTCCGAGAGGCTTTTGTTCGCTA          |                  |

|         |         |  |                           |
|---------|---------|--|---------------------------|
| 21[56]  | 18[48]  | AAATGTTTTATTAGCGATTAAGA                        | 3'-TCO/Cy5 (18nm/9nm)     |
| 3[96]   | 5[102]  | TCCAAGAAGATAAGTCGCCAGTT                        | 3'-Cy5 (3nm)              |
| 5[120]  | 2[112]  | TATCGGCCGAACCGCCTGTTTTAT                       |                           |
| 24[79]  | 27[71]  | TGCCCCCTGCCTATTTGCGCATAG                       |                           |
| 1[24]   | 3[47]   | GCCAGTGCCAAGCTTTCTCAGGAGTAAGTTGGAAGGGGGA       |                           |
| 7[144]  | 4[144]  | ACGATTTTTGTGTTAAATCGTAGGAATCAGCC               |                           |
| 3[118]  | 0[120]  | AGTACCGCACAGGGCTTA                             |                           |
| 5[48]   | 0[56]   | TGGGATAGGCGGGCCTTGTGCTGTGTAGAAACAAAATAA        |                           |
| 31[168] | 32[152] | TACCATATCTGAATAATGGAAGGGCGCCGACA               |                           |
| 7[16]   | 4[24]   | GGGCTTAAGCTACGTGATCGGCTG                       |                           |
| 30[143] | 32[120] | GGATTTGTAAACAGCAACCATCGCCACGCATAACCGAT         |                           |
| 9[80]   | 4[88]   | AAATATTTGCATTA AACAGAGCCTAATTTGCCGCCATTC       |                           |
| 16[183] | 16[184] | GCTTCTGTATCCTTGAAAACATAGATAACCTT               |                           |
| 13[120] | 8[112]  | TAAAGGTGAGCTGATAAAATTAATCGGGGAGAAATAAAAAC      |                           |
| 2[39]   | 7[47]   | GTAACGCCGGCGGATTGACCGTAATTCATCAACGTCTGGC       |                           |
| 1[120]  | 3[143]  | TGTAATTTAGGCAGAGGCATTTTCATGTTCAAGCAAGCA        |                           |
| 4[15]   | 1[15]   | CACATAAATCATTCTCTCGTCGGGTAAGCAACGCCCTGCCATTGTA |                           |
| 1[80]   | 3[71]   | GAATTCATGTCAACCTTATGACAATGTCCCGCCAATCAA        |                           |
| 18[135] | 21[143] | GCGACAGAAGGCAGGTGACGACGAT                      |                           |
| 22[143] | 25[143] | CCACATCAGTTGAGATGGCGGATAAGTGCCCGT              |                           |
| 7[104]  | 11[103] | AAATAAACAGGGAAGCTATTTTGAAGGGTGA                |                           |
| 18[39]  | 23[47]  | GAAAGACTGTTTTGCCAGAGGGGGACCTCGTATTTTAAG        |                           |
| 21[152] | 17[159] | ATATTTACTCGATAGCAGCCGCTCTCATCACCAGTAGCA        |                           |
| 8[55]   | 4[56]   | TAACCAATCTTCTGTTTACCAACCGATCGGT                |                           |
| 22[167] | 25[183] | AGCGCAGTAGTATAGCCCGGAATAGGTGTTCTG              |                           |
| 11[128] | 15[135] | CCATCAATATGATAATTTTAAGAAAAGTAAGCATCACCGT       |                           |
| 26[135] | 29[143] | ACCCTCAGGATTTGTATCCACAGA                       |                           |
| 5[184]  | 7[175]  | ATCTTCTGTTTTAGTTAATAAGGCTTATCCGGCGCGAGAA       |                           |
| 9[120]  | 6[112]  | TTAACTGATGCGGGAGGTTTTGAA                       | 3'-TCO/Cy5 (3nm)          |
| 28[175] | 31[167] | TAACGTGAGTGAATATTAGAACC                        |                           |
| 8[47]   | 11[39]  | AGGAACGCCATCAAAAAATTTTT                        |                           |
| 14[39]  | 19[47]  | AAATTAAGCGGAAGCAAACCTCAAGGAAGCCCGGATTGC        |                           |
| 4[47]   | 7[39]   | CTTCGCTATTACGCCAATAATTCG                       | 5'biotin                  |
| 28[87]  | 24[88]  | TTAGCCGGACCTTCATCAAGAGTACCGTATAA               |                           |
| 5[112]  | 3[117]  | GACGACAGCCGAAACAAACCA                          | 5'-TCO/Cy5 (3nm)          |
| 18[127] | 16[112] | ATCAAGTTTGCCTTTATTAGAGCTACGGTGTG               |                           |
| 1[88]   | 3[111]  | GCGCACGACTTAAGTGTTTTAACAAACAATAACGGGTATT       |                           |
| 25[152] | 21[151] | TTGATATACTGAAATTTACCGTTTGGCCTTG                |                           |
| 8[183]  | 8[184]  | TGCTGATGAACTTTTCAAATATATATGTA                  |                           |
| 4[79]   | 7[71]   | CAACTGTTGGGAAGGGGCTAACGA                       |                           |
| 2[167]  | 5[183]  | GTCCAGACTAGCAAGCAAATCAGATATAGTTT               |                           |
| 20[15]  | 19[7]   | TTGGGCGCCAGGGTGGAGCTGCAT                       |                           |
| 30[79]  | 32[56]  | ATTGCGAAAAAGGCTTTTGGCGGATCGTCACCCTCAGCA        |                           |
| 22[103] | 25[111] | GCAGATACGATTAGGATTAGCGGG                       |                           |
| 7[112]  | 4[120]  | AGCCATATTATTATCTTCTGGTG                        |                           |
| 31[112] | 28[120] | AGCTTGCTTTCGAGGTTGATAAA                        |                           |
| 26[71]  | 29[79]  | AAATCAACTACACTAAAACACTCA                       |                           |
| 20[79]  | 23[71]  | ATGACCATAAATCAAACAGTCAGG                       |                           |
| 30[103] | 32[112] | GAATAGAATATCATTTTGCAGAAACAAAGAAACATATTCGG      |                           |
| 23[8]   | 23[7]   | GCTGATTGCAAGCGGTCCACGCTGGGGCAACA               |                           |
| 12[52]  | 8[56]   | TTTATCATATATTTTAAATGCTCATTTTT                  |                           |
| 16[23]  | 12[24]  | GCGTTGCGTGAGTGAGCTAACTCATTGTTATC               |                           |
| 30[7]   | 28[16]  | TCCAGTTTGGGTTGAGTGTAATACGTAATGCCAAATCAA        |                           |
| 10[143] | 13[143] | AACATTCACCGTTCTGCAACATATAAAGAA                 |                           |
| 10[39]  | 13[47]  | AGAGAATCAACATTATGACCCTGT                       |                           |
| 24[52]  | 27[39]  | ATTTTAATCATTGTGAATTACGAAAGAGG                  |                           |
| 4[175]  | 7[167]  | TTGAAATACCGACCGTACAAAGAA                       | 5'biotin                  |
| 27[48]  | 24[53]  | ACGGTGTACAGACCGGAAACCTATT                      | 5'biotin                  |
| 32[183] | 33[191] | TTATACTTCAAAATTTTGCAGGTGTTTGAATCCTGAT          |                           |
| 6[143]  | 8[128]  | AGCGAAACAAATAAGAAAGCAGCCTTTACAGAG              |                           |
| 10[63]  | 9[55]   | TTGCCTGAGAGTCTGGAAAAGCCC                       |                           |
| 1[112]  | 0[96]   | CGCCAACAATTGAGAATCGCCATATCCTTAGT               |                           |
| 13[80]  | 8[88]   | TTATTACGGCAATAATGTAGGTAAAGATTCAATAAAATTC       |                           |
| 14[47]  | 19[39]  | AATTAGCAAATAACCTATTAGATACATTTTCGCAAGCAAAG      |                           |
| 18[7]   | 17[23]  | GTCGTGCCAGTCGGGAAAGAGCTTCAAAGCG                |                           |
| 12[116] | 8[120]  | CAAAGGGAGACAGTCAAATCAAGAATAAC                  |                           |
| 28[119] | 24[117] | TGTGTCGACAAGCCCAATAGGAACTTTAACGGGGT            |                           |
| 20[151] | 16[144] | CCGCCACCCCTCAGAGCCACCACTAGAGCCAGCAAAAAC        |                           |
| 30[71]  | 32[80]  | TAATAATTAACGTTATTAATTTTAAAGTTTGGAGCCGCT        |                           |
| 5[103]  | 6[102]  | TGAGGGGACGCCCTTAAATC                           | 3'-TCO/Cy5 (18nm/6nm/3nm) |
| 10[71]  | 15[79]  | TCAGGTGAGCATGATTAAGACTCCAACATCCACGCGAGCT       |                           |
| 12[183] | 12[184] | TCAATAGTCCTTTTTAACCTCCGGGAGAAGAG               |                           |
| 20[47]  | 23[39]  | TGACTATTATAGTCAGCTTATCGG                       |                           |
| 19[16]  | 16[24]  | CGGCAACCGCGGGGCTTAAT                           | 5'biotin                  |
| 24[183] | 24[184] | ACCAAGTTAATTACCTGAGCAAAACTTTGAAT               |                           |
| 17[80]  | 12[88]  | CCTTTTGATTGATTCGAAAAGGTGGCATCAAGAGGAAAC        |                           |
| 23[128] | 27[135] | AGGTAGAAAAGATTGTATGACTGGTAATAAGTCCATGTAC       |                           |
| 27[144] | 24[152] | TGAGTTTCTGACCAGTTTGATGA                        |                           |
| 18[143] | 20[128] | AATCAGTAAACCGCCAAGAACCCACCCAGAG                |                           |
| 16[15]  | 15[7]   | CTCACTGCCGCTTTCAGCCTGGG                        |                           |
| 29[184] | 30[179] | AGAAATTGTAAAAACAGAAACG                         |                           |
| 18[167] | 21[183] | TGAAACCAAAACAAATAAATCCTCATTAAAAAC              |                           |



|         |         |  |
|---------|---------|--|
| 10[83]  | 11[79]  | CTACAAAGGCTAAGTAATGT                           |
| 19[48]  | 16[48]  | ATCAAAAAGTTTGCCATAGATTTAGTTTGACC               |
| 9[152]  | 5[159]  | AATTGAGCGAACGCGAGGCGTTTTCCATTACCGCGCCCAA       |
| 8[79]   | 11[71]  | TTTTTGTTAAATCAGCAATGCCTG                       |
| 4[111]  | 7[103]  | CAGGCAAAGCGCCATTCAAGTTACA                      |
| 23[144] | 20[152] | AGCGTCATACATGGCTCCTCAGAG                       |
| 26[48]  | 31[39]  | ATTCAAGTGAACAGATGACGAACTGACCAACTTTGTAGCAAC     |
| 4[183]  | 4[184]  | TTAATGGTTAAATAAGAATAAACCAACCTAAAT              |
| 11[144] | 8[152]  | GAAATAGCAATAGCTACGTCAAAA                       |
| 18[73]  | 23[79]  | CATAGCCCCAGACTGGATAGCGTCTTACGAGGACGTTGGG       |
| 14[135] | 17[143] | GCGACATTGAATATAATGCTGTAG                       |
| 25[184] | 27[175] | CCTGATTGCAATAACGGATATCACCGTACTCACAGTACCT       |
| 13[152] | 8[144]  | ACACCACGAATAATAAGAGCAAGACAGAGGGTATGAAAAAT      |
| 10[47]  | 15[39]  | AGCAAACAAGAACCCCTTCAACGCAAGGATAAAAAATGGTC      |
| 19[104] | 23[103] | GGAAACCGCTCAAATGCTTTAAACAATAAAAAAC             |
| 26[39]  | 29[47]  | ATAAGGCTGGCACCAACCTAAAAAC                      |
| 1[48]   | 3[39]   | AAGCCAGGCCCGCTTCTAATCTATTTACGCTGCTGGCGA        |
| 0[151]  | 3[135]  | AGTATAAAGCCAACGCTCAACAGTTCATCGAG               |
| 27[16]  | 24[24]  | TCCGAAATCGGCAAAACCTGAGAG                       |
| 30[178] | 33[183] | TCTTCCAGACGTTAGTAAAGATGATGGCAATTCAATATA        |
| 1[152]  | 1[183]  | AATAAGAGAATATAAAGTACCGACAAAAGATT               |
| 5[80]   | 0[88]   | TCGTAAACAGGCTCGCTGTCTTCTTATCATGCTGAATT         |
| 0[191]  | 3[175]  | AAGCCTGTAAGAAACCGGAATCATAGTAAAGTAATTTAAGGCGT   |
| 6[101]  | 13[111] | AAGATTAACGTTTAGCTATAGCAAAACGTAGAAAA            |
| 14[143] | 19[135] | ACAAAAGGCCACCGACTATGTTTTAAATATGCAACCCCTCAG     |
| 0[183]  | 3[167]  | TTAGTATCATATGCGTTATACAAAGTGATAAA               |
| 16[175] | 19[167] | AAATCGTCGCTATTAATTTGAAT                        |
| 2[71]   | 5[79]   | TCCTAATTGGTGTAGATGGGCGCA                       |
| 30[135] | 32[144] | CTAAACAAGGAGCGGAATTTATCATCATATCCATGACAAC       |
| 10[167] | 13[183] | TTAAGCCGAATAAGTTTATTTTGTCACAATT                |
| 6[39]   | 9[47]   | CATTAATCCCGTTGATAATCAG                         |
| 7[8]    | 7[7]    | AGTAAACATAAAGACGGAGGATCCGTGTAATG               |
| 11[104] | 12[96]  | GAAAGGCCTTACCAGAAGGAAACC                       |
| 29[120] | 25[119] | ACAACGGAAACCGCCACCCTCAGAGTTTTGCT               |
| 12[175] | 15[167] | GAATTTATCAAATCATTAAATTT                        |
| 30[111] | 32[88]  | CGGAGTGAGGTTTATCTCGCTGAGGCTTGCCAGGGAGTTAA      |
| 33[152] | 28[144] | TGATTATCATGAATTTTCTGTATGCAGCCCTCACAACGCC       |
| 17[102] | 18[102] | TGCGGATGGCGCTCAGACT                            |
| 24[116] | 20[112] | CAGTGGGAACAACATTATTACCCGCCGCCAGCATCCC          |
| 12[79]  | 15[71]  | AACGGAATACCCAAAAATTTGGGG                       |
| 31[8]   | 31[7]   | AGTCCACTGAAAAACCGTCTATCAGGAACAAG               |
| 28[79]  | 31[71]  | AACGAGGCGCAGACGGCTCCAAAA                       |
| 6[15]   | 4[16]   | CCGTCCTCTGTTGCCGAACCTGAGGATTCTCCGTGGACGATT     |
| 15[144] | 12[152] | TGAGCCATTTGGGAATCTTACCG                        |
| 9[88]   | 6[84]   | AAATTGTAAGTTGCTATTTT                           |
| 17[48]  | 13[63]  | CAGGTCAGGATTAGAGTACAGGCAAGGCAAGAATACTTTGCGGCTG |
| 20[183] | 20[184] | AAATTAATTTAATGGAAACAGTACAGAAAAACA              |
| 15[96]  | 19[103] | TTCTGACGGAAATTTGGAAGTTTCATTCACCACCACC          |
| 33[120] | 29[119] | CACCAGAACTTCAACAGTTTCAGAACAAAGT                |
| 14[167] | 17[183] | TCATATGGCCATTACCATTAGCAAGGCCGTAT               |
| 6[71]   | 9[79]   | AATTTTATGGAAGATTGTATAAGC                       |
| 10[7]   | 8[16]   | CGAATTCGCCGGTACCGATAGCATGTAATCTACCTCGA         |
| 1[56]   | 3[79]   | GTGGATGTTCTTAAGTGTTGTATATCCCAATAATCGGG         |

3'-TCO/Cy5 (18nm)

3'-TCO/Cy5 (6nm)

## Abkürzungsverzeichnis

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| $J(\lambda)$                | Überlappungsintegral   |
| $\lambda_{\text{Abs. max}}$ | Wellenlänge des Absorptionsmaximums  |
| $\lambda_{\text{Em. max}}$  | Wellenlänge des Emissionsmaximums  |
| $\tau$                      | Fluoreszenzlebensdauer   |
| $\tau_{\text{AN}}$          | Fluoreszenter Anzustand  |
| $\tau_{\text{AUS}}$         | Nicht fluoreszenter Auszustand   |
| $\tau_{\phi, \text{Amp.}}$  | Mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer                           |
| $\sigma_{\text{lok}}$       | Lokalisationsgenauigkeit   |
| A                           | Akzeptor   |
| AA                          | engl. ascorbic acid  |
| Al647                       | Alexa Fluor 647  |
| a.u.                        | engl. arbitrary unit   |
| COS-7                       | engl. CV-1 african green monkey fibroblast cell line with SV40 genes           |
| Cy5                         | Cyanin 5   |
| Cy7                         | Cyanin 7   |
| D                           | Donor  |
| DNA                         | engl. deoxyribonucleic acid  |
| DNA-PAINT                   | engl. DNA points accumulation for imaging in nanoscale topography              |
| DOL                         | engl. degree of labeling   |
| dSTORM                      | engl. <i>direct</i> stochastic optical reconstruction microscopy               |
| EB                          | Erythrosin B   |
| EM – CCD                    | engl. electronic multiplying charged coupled device                            |
| FCS                         | engl. fluoreszenz correlation spectroscopy                                     |
| FRC                         | engl. fourier ring correlation   |
| FRET                        | Förster-Resonanz-Energietransfer   |
| GABA-A                      | eng. Gamma-aminobutyric acid type A  |
| $G_n$                       | Dendrongeneration  |
| GlucOx                      | engl. glucose oxidase  |
| GluK2                       | engl. glutamate receptor of the kainate receptor family                        |
| $G(\tau)$                   | Autokorrelationsfunktion   |
| HEK293T                     | engl. Human Embryonic Kidney expressing mutant version of SV40 large T-antigen |
| HPLC                        | engl. high performance liquid chromatography                                   |
| $I_{\text{AN}}$             | Intensität des Anzustandes   |
| IC                          | engl. internal conversion  |
| IEDDA                       | engl. inverse electron demand diels alder                                      |
| IgG                         | Immunglobulin G  |
| IRF                         | engl. instrument response function   |
| ISC                         | engl. intersystem crossing   |
| KOH                         | Kaliumhydroxid   |
| MEA                         | $\beta$ -Mercaptoethylamin   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| NA                    | Numerische Apertur   |
| NHS                   | N-Hydroxysuccinimid  |
| OD                    | Optische Dichte  |
| ox.                   | oxidiert   |
| PALM                  | engl. photoactivated localization microscopy                       |
| PAMAM                 | poly(amidoamin)  |
| PBS                   | engl. phosphate buffered saline                                    |
| PET                   | engl. photoinduced electron transfer                               |
| PEG <sub>400</sub>    | Polyethylenglycol 400  |
| pH                    | lat. pondus hydrogenii   |
| ph (/ ms)             | Photonen (pro Millisekunde)  |
| PMT                   | engl. photomultiplier tube   |
| PSF                   | Punktspreizfunktion  |
| Q                     | engl. quenching  |
| QY                    | engl. quantum yield  |
| red.                  | reduziert  |
| Ref.                  | Referenz   |
| RESOLFT               | engl. reversible saturable optical linear fluorescence transitions |
| s                     | Sekunden   |
| SA ( $\sigma_{x/y}$ ) | Standardabweichung (in x- und y-Richtung)                          |
| S <sub>n</sub>        | Singulett-Energiezustand (n = Energieniveau)                       |
| SPAD                  | engl. single-photon avalanche diode                                |
| STED                  | engl. stimulated emission depletion                                |
| TCO                   | Trans-Cycloocten   |
| TCSPC                 | engl. time correlated single photon counting                       |
| TEM                   | Transmissionselektronenmikroskop                                   |
| (R-)Tet               | Tetrazin (R = Rest, H für Wasserstoff, Me für Methyl)              |
| TIRF                  | engl. total internal reflection fluorescence microscopy            |
| U                     | engl. unit   |
| UV                    | Ultraviolett   |
| Vis                   | engl. visible  |
| w/v                   | engl. weight per volume  |

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hierbei gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Sauer einen besonderen Dank, da er es mir ermöglicht hat diese Arbeit am Lehrstuhl für Biophysik & Biotechnologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg anzufertigen. Du hast stets eine familiäre Atmosphäre und ein optimales freundschaftliches Arbeitsklima geschaffen. Des Weiteren standest du mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hattest stets ein offenes Ohr für meine Anliegen. Vielen Dank, das du mich stets Unterstützt hast und mir die Freiheit gegeben hast mich auch während meiner Doktorarbeit wissenschaftlich frei zu entfalten. Ich bin dankbar für die gemeinsame Zeit, das fachliche Wissen, das du mir während meiner gesamten Zeit als Doktrant vermittelt hast und die zahlreichen Erinnerungen der Arbeitsgruppenausflüge.

Auch möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Dr. Sebastian van de Linde für seine Unterstützung bedanken. Du hast mich während meiner Masterarbeit auf den Pfad der Photophysik gebracht und mir die Freude an diesem Gebiet übermittelt, was den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat. Auch wenn du nicht in unmittelbarer Nähe von Würzburg warst, hattest du stets ein offenes Ohr und dir die Zeit genommen auch virtuell hilfreiche Ratschläge zu erteilen und wertvolle Diskussionen zu führen.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen Kollaborationspartnern bedanken, mit denen ich während dieser Arbeit zusammenarbeiten durfte und die mir geholfen haben:

Prof. Dr. Jürgen Seibel möchte ich für die chemische Synthese sowie fachliche Unterstützung danken. Ebenfalls danke ich herzlich Dr. Natalia Wolf und Louise Kersting für ihre wertvolle Zusammenarbeit und vielen Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Christian Stigloher, Anne Krügl und Daniela Bunsen möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung und die fachliche Expertise zur DNA-Origami Qualitätskontrolle via Elektronenmikroskopie bedanken. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Dr. Ingrid Tessmer bedanken, die mich ebenso mit ihrer fachlichen Expertise freundlich bei der Qualitätskontrolle der DNA-Origami Konstrukte mit AFM-Aufnahmen unterstützt hat.

Bei PD. Dr. Sören Doose möchte ich mich herzlich für die vielen Gespräche und Diskussionen sowie seine wertvolle Zusammenarbeit und Unterstützung in allen Teilprojekten bedanken.

Bei Dr. Andreas Kurz möchte ich mich für die fachliche Unterstützung in allen Fragen zur Optik und Justage des Mikroskopaufbaus bedanken.

Dr. Teresa Klein danke ich für alle freundschaftlichen und wertvollen Gespräche. Als Bürokollegin hattest du stets ein offenes Ohr für alle meine Anliegen und hast mit deiner hilfbereiten Art den Arbeitsalltag erleichtert.

Mara Meub möchte ich für ihre Unterstützung und ihre Zusammenarbeit in den DNA-PAINT Teilprojekten bedanken. Auch Alexander Kuhlemann möchte ich in diesem Zusammenhang danken, der mir auf dem Gebiet der Klick-Chemie, zusammen mit Dr. Gerti Beliu, hilfreich zur Seite stand.

Weiterführend möchte ich mich bei den technischen Angestellten Petra Geßner, Lisa Behringer-Pließ und Marcus Behringer für die gute Zusammenarbeit und ihr Fachwissen danken. Darüber hinaus gilt ein besonderer Dank auch Astrid Thal und Cornelia Hellmuth-Gürz, für die Hilfsbereitschaft bürokratische Hürden unkompliziert und leicht zu meistern.

Über die Jahre wurden aus Kollegen sehr gute Freunde. Daher möchte ich an dieser Stelle nochmals Alexander Kuhlemann (Stalli) und Dr. Gerti Beliu, sowie Patrick Eiring erwähnen. Darüber hinaus wurden auch sehr gute Freunde, die ich schon im Bachelorstudiengang Biologie ins Herz geschlossen habe, hilfbereite Arbeitskollegen. Daher möchte ich mich auch bei Dr. Jonathan Schubert, seiner Freundin Dr. Suhaila Rajab und bei Charlotte Rat bedanken. Ihr alle habt mir nicht nur fachlich geholfen, sondern habt auch privat mein Leben bereichert, sowie für unzählige unvergessliche Momente gesorgt und dafür bin ich euch sehr dankbar. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Dr. Jan Schlegel, Nora Trinks, Sebastian Reinhard, Marvin Jungblut, Mara Meub, Danush Taban und Stefan Sachs für die zahlreichen Kaffepausen, Seminardiskussionen oder Arbeitsgruppenausflüge bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken. Meine wundervollen Eltern Michael und Ute, meinen Onkel Andreas, sowie meiner Schwester Nadine mit ihren zwei bezaubernden Kindern. Danke für euere immerwährende Unterstützung. Ich bin Stolz diese Familie zu haben.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Freundin Janna Eilts bedanken, die mich stets unterstützt und mir vor allem in den letzten Zügen dieser Arbeit zur Seite stand.

---

**Publikationsliste**

**Manuskript 1: Dominic A. Helmerich**, Gerti Beliu, Markus Sauer. "Multiple-Labeled Antibodies Behave Like Single Emitters in Photoswitching Buffer." ACS Nano, 14 (10), 12629-12641, 2020

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06099>

**Manuskript 2: Helmerich, D.A.\***, Beliu, G.\*, Matikonda, S.S. et al. "Photoblueing of organic dyes can cause artifacts in super-resolution microscopy.", Nat. Methods 18, 253-257, 2021

<https://doi.org/10.1038/s41592-021-01061-2>

**\*Geteilte Erst-Autorenschaft**

**Manuskript 3: Siddharth S. Matikonda\***, **Dominic A. Helmerich\***, Mara Meub, Gerti Beliu, Philip Kollmannsberger, Alexander Greer, Markus Sauer, und Martin J. Schnermann. "Defining the Basis of Cyanine Phototruncation Enables a New Approach to Single-Molecule Localization Microscopy.", ACS Central Science, 7 (7), 1144-1155, 2021

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00483>

**\*Geteilte Erst-Autorenschaft**

**Manuskript 4: Eiring P**, McLaughlin R, Matikonda S, ZHONGYING HAN, Grabenhorst L, **Helmerich D**, et al. "Targetable Conformationally Restricted Cyanines Enable Photon-Count Limited Applications.", ChemRxiv. Cambridge: Cambridge Open Engage, 2021

DOI: 10.26434/chemrxiv.14720883.v1

**Manuskript 5: Jan Christoph Thiele**, **Dominic A. Helmerich**, Nazar Oleksiievets, Roman Tsukanov, Eugenia Butkevich, Markus Sauer, Oleksii Nevskyi, und Jörg Enderlein. "Confocal Fluorescence-Lifetime Single-Molecule Localization Microscopy.", ACS Nano, 14 (10), 14190-14200, 2020

DOI: 10.1021/acsnano.0c07322

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Helmerich Dominic

Geburtsdatum

Geburtsort

Nationalität

Familienstand

### Schulausbildung

**1995 - 1999** Grundschule Kolitzheim

**1999 - 2002** Hauptschule Kolitzheim

**2002 - 2006** Wirtschaftsschule O. Pelzl Schweinfurt

**2006 - 2008** Ausbildung zum staatlich geprüften Fremdsprachenkorrespondenten  
(Institut für Fremdsprachen gGmbH (IFS)) Schweinfurt

**2008 - 2012** Bayernkolleg Schweinfurt

**Juni 2012** Abitur

### Hochschulausbildung

**2012 - 2015** Studium der Biologie B.Sc.  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
(Untersuchung der Konformationsdynamik der ATP Bindungsdomäne im C –  
terminal verkürzten Chaperon Hsp90)  
Betreuer: Dr. Hannes Neuweiler

**2015 - 2017** Studium der Biologie M.Sc.  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
(Intensity – based multi-colour localization microscopy)  
Betreuer: Dr. Sebastian v. d. Linde

**Seit 2017** Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. Markus Sauer

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dominic Helmerich

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Einflüsse der Photophysik und Photochemie von Cyaninfarbstoffen auf die Lokalisationsmikroskopie**“, eigenständig, d, h, insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben,

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat,

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw, Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde,

## Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Impact of photophysics and photochemistry of cyanine dyes on localization microscopy**“ is the result of my own work, I did not receive any help or support from commercial consultants, All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis,

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form,

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly,

Würzburg, den \_\_\_\_\_

---